

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Pharmakologische Inhibition der lysosomalen sauren Lipase als neuartiger Ansatz in der adjuvanten Brustkrebstherapie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Theresa Bozzetti

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Tanja Fehm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Georg Pongratz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

H. Steigerwald, T. Bozzetti, M. Tams, J. On, G. Hoffmann, J. Lambertz, K. Weidele, S. Treitschke, F. Reinhard, A. Kulik, N. Krawczyk, D. Niederacher, H. Neubauer, C. Werno, T. Rau, T. Fehm, K. Esser: Lysosomal acid lipase-activity as a novel target to efficiently address triple-negative breast cancer high malignancy, bioRxiv 2023.10.01.560038. (Preprint), <https://doi.org/10.1101/2023.10.01.560038>

Zusammenfassung

Im Brustkrebs spielt der Lipidstoffwechsel über die erhöhte Aufnahme, Synthese und Speicherung von neutralen Lipiden (Cholesterinester und Triglyceride) eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung wichtiger tumorspezifischer Funktionen, wie Tumorphiliferation und -migration. Die Quelle zur Anreicherung der neutralen Lipide ist im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs hauptsächlich die endogene Lipid-Synthese, während im triple-negativen Brustkrebs vermehrt exogene Lipidquellen eine Rolle spielen. Eine potentielle therapeutische Strategie ist die pharmakologische Hemmung der lysosomalen sauren Lipase mit dem spezifischen Inhibitor Lalistat, um die Hydrolyse der aufgenommenen neutralen Lipide und ihre nachfolgende zelluläre Verwertung zu blockieren. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Einordnung der Lipasehemmung in der adjuvanten Brustkrebstherapie anhand unterschiedlicher *in-vitro* Modelle. Ein Aspekt war die Untersuchung der adjuvanten Wirkung von Lalistat auf die Anthracyclin-induzierte Apoptose und Antiproliferation in triple-negativen Brustkrebszellen. Ein weiterer Aspekt war die adjuvante Wirkung von Lalistat im Rahmen der Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten Zelllinie. Zusätzlich wurde die adjuvante Wirkung der Lipasehemmung auf Tamoxifen in Tamoxifen-resistenten und Tamoxifen-sensiblen Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen untersucht.

Nach dreitägiger Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Lalistat und einer entsprechenden Kontrolle wurden die Zelllinien jeweils mit Doxorubicin, Paclitaxel und Tamoxifen inkubiert. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) wurde dann mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays bestimmt. Zur Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten Zelllinie wurden die MDA-MB-231 über sieben Monate lang niedrig dosiert intermittierend mit Paclitaxel behandelt und anschließend dann weiter molekular charakterisiert.

Sowohl in triple-negativen Brustkrebszellen inklusive der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen als auch in Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen konnte bei adjuvanter Lalistat-Behandlung eine Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden. In Tamoxifen-resistenten Zellen war der Effekt ausgeprägter als in Tamoxifen-sensiblen Zellen. Bei den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen ließen sich Veränderungen in Morphologie und Proliferation gegenüber unbehandelten Zellen feststellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Lalistat-Behandlung zu einer höheren Chemosensitivität im triple-negativen Brustkrebs inklusive Paclitaxel-langzeitbehandelten Zellen als auch in Tamoxifen-resistenten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen führt. Über Hemmung der sauren Lipase sinkt die zelluläre Verwertung der neutralen Lipide und damit auch die Beta-Oxidation in Mitochondrien. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die langfristig niedrig dosierte Paclitaxel-Behandlung keine Chemoresistenz verursacht, stattdessen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Zelldifferenzierung zunimmt.

Abstract

In breast cancer, lipid metabolism plays a central role in the maintenance of important tumor-specific functions, such as tumor proliferation and migration, via increased uptake, synthesis, and storage of neutral lipids, e.g. cholesterol ester and triglycerides. The source of neutral lipid accumulation in hormone receptor-positive breast cancer is mainly endogenous lipid synthesis, whereas in triple-negative breast cancer, exogenous lipid sources play an increased role. A potential therapeutic strategy is pharmacological inhibition of lysosomal acid lipase with the specific inhibitor Lalistat to block hydrolysis of neutral lipids after uptake by the cell and their subsequent cellular utilization.

The aim of this work was to investigate and classify lipase inhibition in adjuvant breast cancer therapy using different in vitro models. One aspect was to investigate the adjuvant effect of Lalistat on anthracycline-induced apoptosis and antiproliferation in triple-negative breast cancer cells. Another aspect was the adjuvant effect of Lalistat in the context of the development of a long-term paclitaxel-treated cell line. In addition, the adjuvant effect of lipase inhibition on tamoxifen in tamoxifen-resistant and tamoxifen-sensitive hormone receptor-positive breast cancer cells was investigated.

After three days of preincubation with different concentrations of Lalistat and an appropriate control, the cell lines were incubated with doxorubicin, paclitaxel and tamoxifen, respectively. The mean inhibitory concentration (IC₅₀) was then measured using the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. To develop a long-term paclitaxel-treated cell line, MDA-MB-231 were treated intermittently with low-dose paclitaxel for seven months and then further molecularly characterized.

In both triple-negative breast cancer cells and hormone receptor-positive breast cancer cells, a reduction in cell viability was observed with adjuvant Lalistat treatment. In tamoxifen-resistant cells, the effect was more pronounced than in tamoxifen-sensitive cells. The long-term paclitaxel treated cells showed changes in morphology and proliferation and a remaining increase of chemosensitivity by Lalistat.

The results possibly suggest that Lalistat treatment leads to higher chemosensitivity in triple-negative breast cancer, including Paclitaxel long-term incubated cells, as well as in tamoxifen-resistant hormone receptor-positive breast cancer cells. Via inhibition of acid lipase, cellular utilization of neutral lipids decreases and thus beta-oxidation in mitochondria. Long-term low-dose paclitaxel treatment does not cause chemoresistance; instead, results suggest that cell differentiation increases.

Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
ALND	Axillary lymph node dissection
ATP	Adenosintriphosphat
BCSC	Breast Cancer Stem Cell
BET	Brusterhaltende Therapie
BMI	Body-Mass-Index
°C	Grad Celsius
ca.	Zirka
cDNA	Komplementäre DNA
CE	Cholesterinester
CoA	Coenzym A
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
ER+	Östrogenrezeptor-positiv
FAS	Fettsäure-Synthase
FC	Freies Cholesterol
FCS	Fetales Bovines Kälberserum
for	Forward
FS	Fettsäuren
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HER2-	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2-negativ
Hh	Hedgehog
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
kg	Kilogramm
LAL	Lysosomal acid lipase
LD	Lipid Droplets
LDL	Low-Density-Lipoprotein
m	Meter
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
n.s.	Nicht signifikant
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
∅	Arithmetischer Mittelwert

o.g.	Oben genannt
PALP2	Partner and Localizer of BRCA2
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCR	Pathologic complete response
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin
PgR	Progesteronrezeptor
PgR+	Progesteronrezeptor-positiv
PPW	Pentosephosphatweg
rev	Reverse
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	Siehe
SD	Standardabweichung
s	Sekunde
SERM	Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
SLNB	Sentinel Lymph Node Biopsy
TAG	Triglyceride
TNBC	Triple-negativer Brustkrebs
VEGF	Endothelwachstumsfaktor
z.B.	Zum Beispiel
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Subtypen	1
1.1.3 Therapieoptionen	3
1.1.3.1 Operative Therapie	3
1.1.3.2 Adjuvante Strahlentherapie	4
1.1.3.3 Adjuvante Systemtherapie	5
1.2 Formen der Tumorzellaberrationen	9
1.2.1 Genetische Aberrationen	9
1.2.2 Epigenetische Aberrationen	9
1.2.3 Dysregulierter Metabolismus	10
1.3 Lipidstoffwechsel	10
1.3.1 Akkumulierung von neutralen Lipiden	10
1.3.2 Zelluläre Verwertung der neutralen Lipide	11
1.3.3 Einfluss auf den Tumorstammzellcharakter	12
1.4 Lysosomale saure Lipase	13
1.4.1 Bedeutung der sauren Lipase im Lipidstoffwechsel	13
1.4.2 Potential in der Antitumor-Therapie	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Zusammensetzung der Zellkulturmedien	17
2.3 Verbrauchsmaterialien	18
2.4 Wirkstoffe	19
2.5 Zelllinien	19
2.6 Geräte und Gegenstände	20
2.7 Software	21
2.8 Kommerzielle Testkits	21
2.9 Primer	22
3 Methoden	24
3.1 Zellkultur	24
3.1.1 Auftauen von Zellen	24

3.1.2	Kultivierung von Zellen	24
3.1.3	Zählen der Zellen	25
3.1.4	Aussäen der Zellen	26
3.1.5	Einfrieren von Zellen	26
3.2	Doxorubicin	26
3.2.1	Adjuvante Effekte der sauren Lipase Inhibition auf MDA-MB-231 Zellen	26
3.2.2	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.....	27
3.2.3	CellTox® Green Cytotoxicity Assay	28
3.3	Paclitaxel	28
3.3.1	Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten Zelllinie	28
3.3.2	Isolieren von Zellklonen.....	28
3.3.3	Proliferationstestung der Zellklone	29
3.3.4	Adjuvante Effekte der sauren Lipase Inhibition auf die Zellklone.....	29
3.3.5	Quantitative Real Time PCR (qPCR)	30
3.4	Tamoxifen.....	32
3.4.1	Adjuvante Effekte der sauren Lipase Inhibition auf MCF-7 Zellen und Tamoxifen-resistente MCF-7 Zellen	32
3.5	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Untersuchung des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Anti- Tumorwirkung von Anthracyclin in MDA-MB-231-Zellen.....	33
4.1.1	Anthracyclin-induzierte Apoptose.....	33
4.1.2	Anthracyclin-induzierte Antiproliferation	35
4.2	Untersuchung des adjuvanten Effektes der Inhibition der sauren Lipase auf die Anti-Tumorwirkung von Paclitaxel in langzeitbehandelten MDA-MB-231-Zellen	37
4.2.1	Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zelllinie	38
4.2.2	Wachstumsverhalten der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone	38
4.2.3	Molekulare Charakterisierung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA- MB-231 Zellklone	40
4.2.4	Untersuchung eines adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase mit Paclitaxel in einem Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellmodell	47
4.3	Untersuchung des adjuvanten Effektes der Inhibition der sauren Lipase auf Tamoxifen in einem Tamoxifen-resistenten Zellmodell	52
4.3.1	Tamoxifen-induzierte Apoptose/Zelltod	53
5	Diskussion.....	57
5.1	Doxorubicin	58
5.1.1	Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Anthracyclin-induzierte Apoptose	58
5.1.2	Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Anthracyclin-induzierte Antiproliferation	61
5.2	Paclitaxel	62
5.2.1	Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zelllinie	62
5.2.2	Wachstumsverhalten der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone	64

5.2.3	Molekulare Charakterisierung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone	65
5.2.4	Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase mit Paclitaxel in einem Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellmodell	68
5.3	Tamoxifen.....	70
5.3.1	Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase mit Tamoxifen in einem Tamoxifen-resistenten Zellmodell	70
5.4	Limitationen der Untersuchungen	72
5.5	Ausblick	73
5.6	Schlussfolgerungen	74
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Darstellung des intrazellulären Lipidstoffwechsels.....	15
Abbildung 3.1: Schema zum Versuchsaufbau zur Messung adjuvanter Effekte von Lalistat auf MDA-MB-231 Zellen	27
Abbildung 3.2: Versuchsaufbau der 12-Well-Platte zur Isolierung einzelner Zellklone der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zelllinie.....	29
Abbildung 4.1: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von MDA-MB-231 Zellen mit Anthracyclin	34
Abbildung 4.2: Evaluation des nicht-toxischen Bereichs von Doxorubicin.....	36
Abbildung 4.3: Synergistischer Effekt von Lalistat und Doxorubicin auf die Antiproliferation von MDA-MB-231 Zellen.....	37
Abbildung 4.4: Morphologieänderung von MDA-MB-231 Zellen im Verlauf der mehrmonatigen Paclitaxel-Behandlung	38
Abbildung 4.5: Proliferationsmessung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone zu verschiedenen Zeitpunkten.....	39
Abbildung 4.6: Exprimierung von CD44/CD24 in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen	41
Abbildung 4.7: Exprimierung von ALDH1 in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen.....	42
Abbildung 4.8: Exprimierung von E-Cadherin in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen	43
Abbildung 4.9: Exprimierung von Vimentin in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen	44
Abbildung 4.10: Exprimierung von c-Myc in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen.....	45
Abbildung 4.11: Exprimierung von PD-L1 in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen.....	46
Abbildung 4.12: Exprimierung des Östrogenrezeptors in Paclitaxel-Langzeit behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen.....	47
Abbildung 4.13: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von Paclitaxel-langzeitbehandelten MDA-MB-231 Zellen mit Paclitaxel	49
Abbildung 4.14: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von Paclitaxel-langzeitbehandelten MDA-MB-231 Zellen mit Paclitaxel	51
Abbildung 4.15: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen mit Tamoxifen	54
Abbildung 4.16: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von MCF-7 Zellen mit Tamoxifen	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Molekulare Brustkrebs Subtypen.....	3
Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	17
Tabelle 2.2: Übersicht der Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	17
Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Wirkstoffe.....	19
Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Brustkrebszelllinien.....	19
Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Laborgeräte und Gegenstände.....	20
Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Software.....	21
Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten kommerziell erhältlicher Testkits.....	21
Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Primer und Sequenzen für die Real-Time PCR....	22
Tabelle 3.1: Mengenschema zur Zellkultivierung je nach Größe der Zellkulturflasche	25
Tabelle 4.1: Übersicht der IC50-Werte von Lalistat und DMSO in MDA-MB-231 Zellen.....	35
Tabelle 4.2: Übersicht der IC50-Werte von Lalistat im Vergleich zur DMSO Kontrolle	50
Tabelle 4.3: Übersicht der IC50-Werte von Lalistat im Vergleich zur DMSO Kontrolle	52
Tabelle 4.4: Übersicht der IC50-Werte von Lalistat und DMSO in Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen	54
Tabelle 4.5: Übersicht der IC50-Werte von Lalistat und DMSO in MCF-7 Zellen	56

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist aktuell in Deutschland die häufigste Krebserkrankung der Frau und stellt global betrachtet ein wachsendes Gesundheitsproblem dar. Laut Zahlen aus dem Jahr 2019 des Zentrums für Krebsregisterdaten geführt vom Robert Koch-Institut (RKI) werden jährlich 71.375 Neuerkrankungen verzeichnet [1]. Das entspricht mit einer von acht Frauen, die im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken, einem Lebenszeitrisiko von ungefähr 12,8 % [1].

Der männliche Brustkrebs gilt mit einer Inzidenz von ungefähr 1% aller Mammakarzinome als eher selten [2]. Neben dem sich daraus ergebenden Risiko des weiblichen Geschlechts ist es wichtig, die genetischen Ursachen, siehe (s.) Kapitel 1.2.1, von den nicht genetischen Risikofaktoren zu unterscheiden. Das mittlere Erkrankungsalter für Frauen lag laut RKI im Jahr 2018 im Median bei 64 Jahren, somit ergibt sich auch das Altern als wesentlicher Risikofaktor für die Brustkrebsentstehung [2].

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist die Wirkung von Sexualhormonen, vor allem der Östrogene [3, 4]. Somit steigt das Risiko bei einem lang hormonell aktiven Zeitraum des Körpers, wie frühe Menarche, späte Menopause und späte erste Schwangerschaft. Aber auch der Einfluss von Lebensstilfaktoren auf die Brustkrebsentstehung sollte nicht unterschätzt werden. So erhöht sich bei einem Alkoholkonsum von mehr als 45 Gramm (g) pro Tag das Brustkrebsrisiko um 46 % [4, 5]. Auch Übergewicht, definiert als Body-Mass-Index (BMI) größer als 25 kg/m², erhöht das Risiko für den Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs, vor allem in der Postmenopause [4, 6]. Ab einem BMI von 25 kg/m² konnte pro jede weitere fünf kg/m² jeweils eine Risikoerhöhung von 10 % beobachtet werden [4, 6].

1.1.2 Subtypen

In der Brustkrebsforschung wurden innerhalb der letzten zwanzig Jahren vier molekulare intrinsische Subtypen benannt und weiter erforscht [7]. Dazu zählen der Luminal A- und B-Subtyp, der HER2-positive und der basal-ähnliche Phänotyp [7]. Diese vier Typen unterscheiden sich signifikant in der Epidemiologie, der Prognose und im Therapieansprechen [8]. 2011 schlug die St. Gallen Konsensus Konferenz erstmals vor, die intrinsischen Subtypen als Grundlage der Entwicklung individueller Therapieempfehlungen zu nutzen, s. Kapitel 1.1.3. Wichtig für die Definition dieser vier Subtypen sind unter anderem der Hormonrezeptorstatus, die Expression des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) sowie das Ki67-Antigen als Proliferationsindex [9]. In der Literatur liegt der Grenzwert für die Expression des Progesteronrezeptors bei 20 % [10], wohingegen die Definition eines einheitlichen Ki-67 Grenzwert eher problematisch zu sein scheint, jeweils abhängig von verschiedenen

Laborreferenzwerten. Die St. Gallen Konsensus Konferenz 2013, in der weitere Therapiemöglichkeiten für die Subtypen ausgearbeitet wurden, bezieht sich allerdings auf einen Ki-67 Grenzwert von 14 % [11].

Luminal A-Subtyp

Gemeinsam werden die Luminal A- und Luminal B-Tumoren unter der Kategorie des Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs zusammengefasst [11]. Die Luminal A-Tumoren sind dabei definiert als Östrogenrezeptor-positiv (ER+), Progesteronrezeptor-positiv (PgR+), humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2-negativ (HER2-) und ein niedriges Ki-67 [11].

Der Großteil der Luminal A-Tumoren präsentiert sich als gut bis mittel differenziert, mit einer deutlich besseren Prognose in Hinblick auf das krankheitsfreie Überleben und die Metastasierungstendenz im Vergleich zum Luminal B-Phänotyp [12].

Luminal B-Subtyp

Der Luminal B-Subtyp beschreibt eine Gruppe von Tumoren, denen die typischen Luminal A-Merkmale fehlen und kann laut Definition in zwei weitere Untergruppen unterteilt werden [11]. Charakteristika des Luminal B HER2-negativen Phänotyps sind ER+, HER2- und entweder ein Ki-67 oder die PgR-Expression unterhalb des definierten Grenzwertes [11]. Der Luminal B HER2-positive Phänotyp besteht aus den Merkmalen ER+ und HER2+ bei jeglichen Werten für Ki-67 und PgR [11].

Im Gegensatz zum Luminal A-Phänotyp präsentiert sich die Mehrheit der Luminal B-Tumoren als mittel bis schlecht differenziert [12].

HER2-positiver Subtyp

Der HER2-positive Subtyp zeigt eine Überexpression von HER2 auf der Zelloberfläche und wird auf Grund des Fehlens von ER und PgR auch als nicht-luminaler Subtyp bezeichnet [11].

Basal-ähnlicher Subtyp

Der basal-ähnliche Brustkrebs stellt den vierten und letzten molekularen Subtypen dar. Eine relevante Subgruppe des basal-ähnlichen Phänotyps ist der triple-negative Brustkrebs (TNBC), auf Deutsch übersetzt dreifach-negativer Brustkrebs [11, 13]. Wie der Name bereits impliziert, ist eine fehlende Expression des Östrogenrezeptors, des Progesteronrezeptors und von HER2/neu für den TNBC charakteristisch [11, 13].

Ungefähr 10-20 % der Mammakarzinome können auf molekularer Ebene als TNBC-Phänotyp identifiziert werden [14, 15]. Der TNBC gilt als hoch aggressiver Subtyp und ist im Allgemeinen mit einer schlechteren Prognose verbunden als die oben angeführten Subtypen [15]. Die Rezidivwahrscheinlichkeit ist insbesondere in den ersten drei Jahren erhöht [15]. Dabei konnte das Auftreten des TNBC in der Carolina Breast Cancer Studie vermehrt in afroamerikanischen Frauen beobachtet werden und ist zudem mit einem jüngeren Erkrankungsalter assoziiert [14]. Weitere wichtige

Charakteristika des TNBC-Phänotyps sind die Verknüpfung mit BRCA-mutierten Tumoren, s. Kapitel 1.2.1 sowie der auf molekularer Ebene stark ausgeprägte Tumorstammzellcharakter, s. Kapitel 1.3.3.

Auf Grund der beschriebenen fehlenden Rezeptorexpression ergeben sich limitierte therapeutische Optionen für den TNBC. Die Tumorzellen sprechen weder auf die endokrine Therapie noch auf die Antikörpertherapie an, sodass die Chemotherapie derzeit den allgemeinen Behandlungsstandard darstellt [13]. Um Therapieerfolg und -effizienz in der Behandlung des TNBC zu steigern, ergibt sich daher die Notwendigkeit der Entwicklung TNBC-spezifischer therapeutischer Targets [13].

Tabelle 1.1: Molekulare Brustkrebs Subtypen

Abhängig von Rezeptorexpression und Proliferationsindex kann das Mammakarzinom laut Definition in vier molekulare Subtypen eingeteilt werden: Luminal A, Luminal B, HER2-positiv und Basal-ähnlich [16].

Subtyp	ER	PgR	HER2	Ki-67
Luminal A	+	≥ 20 %	-	< 14 %
Luminal B	+	< 20 %	-	> 14 %
Luminal B	+		+	
HER2-positiv	-	-	+	
Basal-ähnlich	-	-	-	

ER: Östrogenrezeptor, PgR: Progesteronrezeptor, HER 2: humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, Ki-67: Proliferationsindex.

1.1.3 Therapieoptionen

1.1.3.1 Operative Therapie

Die Grundlage der Brustkrebstherapie ist die operative R0-Resektion des Tumorgewebes. R0 bedeutet Entfernung des Tumorgewebes bis hinein ins gesunde Gewebe. Die Tumorfreiheit der Resektionsränder ist ein wichtiger Faktor, da sie einen signifikanten Einfluss auf die Lokalrezidivrate zeigt [16, 17]. Eine Orientierung zur postoperativen Bewertung des Resektionsrandes durch die Pathologie ist der Leitspruch „no ink on tumor“ – kein Tuscherand auf dem Tumor [16, 18].

Im Anschluss an die R0-Resektion ist eine Fadenmarkierung des Tumors und eine Clip-Markierung des Tumorbetts für eine postoperative Bestrahlung obligat [16].

In der operativen Therapie des Mammakarzinoms werden zwei grundlegende, hinsichtlich des Gesamtüberlebens gleichwertige Verfahren unterschieden - die Brusterhaltende Therapie (BET) mit anschließender Radiotherapie der Brust und die Mastektomie.

Die BET ist die operative Entfernung des Tumors im Gesunden unter Erhaltung des restlichen Brustgewebes. Die aktuelle S3-Leitlinie „Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ (Version 4.4) definiert für die Durchführung einer BET mögliche Indikationen. Dazu zählen die lokal begrenzten, nicht invasiven Karzinome der Brust, Karzinome mit einer günstigen Brust-Tumor-Relation und invasive Karzinome solange eine R0-Resektion möglich erscheint [16]. Eine der wichtigsten Voraussetzungen der BET ist die nachfolgende Bestrahlung der Brustdrüse [16]. Hinsichtlich der postoperativen Lebensqualität und dem kosmetischen Ergebnis ist die BET der Mastektomie überlegen [16, 19].

Die Mastektomie ist definiert als die komplette Entfernung der Brustdrüse beim Mammakarzinom. Auch für die Mastektomie definiert die aktuelle S3-Leitlinie klare Indikationen. Bei inkompletter Tumorentfernung, beim inflammatorischen Mammakarzinom, bei Kontraindikationen für die postoperative Radiatio der Brust und bei individueller Präferenz der Patientin sollte die Mastektomie einer BET vorgezogen werden [16].

Neben der lokalen Tumorentfernung stellt das axilläre Lymphknoten Staging eine weitere wichtige Säule in der operativen Brustkrebstherapie dar. Die Methode der Wahl ist dabei zunächst die Sentinellymphknoten-Entfernung (engl: Sentinel Lymph Node Biopsy, SLNB) der axillären Lymphknoten, da diese die Hauptlymphabflussbahn der Brust bilden [16]. Das Konzept des Sentinellymphknotens, auf deutsch: Wächterlymphknoten, stammt aus dem Jahr 1977 und beschreibt den ersten Lymphknoten des Lymphabflusses eines Gewebes [16, 20]. Präsentiert sich dieser Lymphknoten in der Biopsie als tumorfrei, wird davon ausgegangen, dass die nachgeschalteten Lymphknoten auch tumorfrei sind.

Hauptindikationen für die SLNB sind der operable Brustkrebs bei klinisch unauffälligen Lymphknoten, das duktales Carcinoma in situ (DCIS) und bei negativem Lymphknotenstatus nach einer neoadjuvanten systemischen Therapie [16, 21].

Unter der axillären Lymphknotendissektion (engl: Axillary lymph node dissection, ALND) versteht man die operative Entfernung verschiedener Lymphknotenstationen im Bereich der Achselhöhle. Die ALND ist vor allem für Frauen mit geplanter Mastektomie bei positivem SLN relevant [16, 21].

1.1.3.2 Adjuvante Strahlentherapie

In Ergänzung der operativen Therapie des Mammakarzinoms ist die adjuvante Strahlentherapie fester Bestandteil des Therapieschemas.

Durch die postoperative Bestrahlung der Brustwand nach BET kann eine signifikante Reduktion der Lokalrezidivraten und der brustspezifischen Mortalitätsraten in allen Brustkrebs-Patientenkohorten erzielt werden [16, 22]. Aber auch nach Mastektomie kann sich die postoperative Bestrahlung zur Vermeidung von Lokalrezidiven als sinnvoll erweisen. Gründe für die Durchführung einer Postmastektomie-Bestrahlung sind dabei vor allem die Ausdehnung des Tumors lokal auf die Brustwand oder nodulär in Form von mehr als drei befallenen Lymphknoten [16].

Bei klar belegbarem Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens von Brustkrebspatientinnen gibt die aktuelle S3-Leitlinie in jedem Fall zusätzlich zur postoperativen Radiatio der Brustwand die Empfehlung zur Bestrahlung der regionalen Lymphabflussgebiete [16, 23].

Prinzipiell spielt die postoperative Reihenfolge der Durchführung von Radio- und Chemotherapie keine Rolle. Empfohlen wird lediglich das sequentielle Vorgehen [16, 24, 25]. In der Praxis hat es sich allerdings durchgesetzt, die Radiotherapie im Anschluss an eine adjuvante Chemotherapie durchzuführen [16, 24, 25].

1.1.3.3 Adjuvante Systemtherapie

Bei der Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Systemtherapie in der Brustkrebsbehandlung werden in den letzten Jahren vermehrt die molekularen Subtypen, s. Kapitel 1.1.2, mit herangezogen [9, 16]. Indikationen für die adjuvante systemische Therapie sind laut der aktuellen S3-Leitlinie HER2-positive Tumoren, triple-negative Tumoren, nodal-positive Tumoren, Tumoren mit G3-Status und ein Erkrankungsalter unter 35 Jahren [16].

Mögliche Formen der Systemtherapie beinhalten die endokrine Therapie, die Antikörpertherapie und die Chemotherapie [16]. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

Endokrine Therapie

Tumoren des molekularen Subtyps Luminal A und B werden auch der Kategorie des Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs zugeordnet. Für diese Patientinnen stellt die endokrine Therapie nach Beendigung einer Chemotherapie eine zuverlässige Behandlungsmöglichkeit dar. Die zwei wichtigsten Substanzklassen der endokrinen Therapie bestehen aus den selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) und den Aromatasehemmern [16]. Auf Grund des unterschiedlichen Wirkmechanismus der beiden Substanzklassen empfiehlt die aktuelle Leitlinie den Menopausenstatus der Patientinnen bei der Therapieentscheidung mit zu berücksichtigen [16].

Bei prämenopausalen Patientinnen lautet die Empfehlung Tamoxifen als SERM für mindestens fünf Jahre einzunehmen [16, 26].

Über den Antagonismus an Östrogenrezeptoren in der Brustdrüse wird das östrogen-abhängige Wachstum von Hormonrezeptor-positiven Tumorzellen durch Tamoxifen gehemmt [27].

Dennoch birgt die Tamoxifen Einnahme einige relevante Nebenwirkungen. Auf Grund der agonistischen Wirkung von Tamoxifen auf das Endometrium ist das Risiko für Endometriumkarzinome vor allem in der Postmenopause etwa um das 2,5-fache erhöht [28]. Daher wird dringend empfohlen, vaginale Blutungen unter Tamoxifen Behandlung ärztlich abklären zu lassen.

Außerdem konnte unter Tamoxifen-Einnahme ein erhöhtes Risiko für vaskuläre Ereignisse wie hämorrhagische Schlaganfälle, vaskuläre Verschlüsse und

Lungenembolien beobachtet werden [28]. Weitere beschriebene Nebenwirkungen sind Flush und Hitzewallungen [28].

Diese bergen auf Grund einer relevanten Beeinflussung der Lebensqualität das Risiko des frühzeitigen Abbruchs der adjuvanten endokrinen Therapie. In einer Studie von Hershman et al. konnte gezeigt werden, dass sich weniger als die Hälfte der Patientinnen nach viereinhalb Jahren noch therapieadhärent zeigt [29]. Diese Non-Compliance der Patientinnen kann unter anderem zur Resistenzentwicklung gegen Tamoxifen führen, die als therapielimitierender Faktor klinisch ein Problem darstellt. Weiterhin werden verschiedene zelluläre Gründe in Bezug auf die Resistenzentwicklung diskutiert.

Eine Möglichkeit scheint die veränderte Östrogenrezeptorexpression zu sein. Unter Tamoxifen konnte in Studien als Reaktion auf die Therapie eine Herabregulation des Östrogenrezeptors beobachtet werden [30, 31]. Eine weitere Theorie ist, dass Tamoxifen gleichzeitig auch Östrogen-agonistische Eigenschaften aufweist und darüber bei längerer Einnahme das Tumorstadium stimulieren kann [31, 32]. Auch die vermehrte Expression von Stammzellen im Brustkrebs, s. Kapitel 1.3.3, scheint eine Rolle bei der Resistenzentwicklung zu spielen. Beim Vergleich Tamoxifen-resistenter und Tamoxifen-sensibler Zelllinien konnte ein deutlich höherer Stammzellgehalt in den resistenten Zellen nachgewiesen werden [33].

In der Postmenopause hingegen empfiehlt die S3-Leitlinie die adjuvante Gabe eines Aromatasehemmers, wie beispielsweise Letrozol, für mindestens fünf Jahre [16]. Der Großteil der Östrogene wird in der Postmenopause statt im Eierstock in peripheren Geweben wie Fettgewebe und Nebenniere produziert [34, 35]. Die periphere Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen wird dabei durch die Aromatase katalysiert [36]. Zudem konnte eine erhöhte Aromatase Aktivität in Brustkrebszellen festgestellt werden [35, 37]. Aromatasehemmer inhibieren sowohl die periphere Aromataseaktivität als auch die erhöhte Aromataseaktivität in Brustkrebszellen [35, 38].

Antikörpertherapie

Bei Tumoren, die eine Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 auf ihrer Oberfläche zeigen, ist die Antikörpertherapie Bestandteil der adjuvanten Systemtherapie [16].

Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen HER2 [39]. Dabei handelt es sich um einen transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptor aus der Familie der ErbB-Rezeptoren [39]. Durch Bindung von Trastuzumab an die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors kommt es zur Hemmung intrazellulärer Signalwege mit nachfolgender Apoptose der Zellen [40].

Das Brustkrebs-Therapieschema laut der aktuellen S3-Leitlinie sieht die simultane Therapie eines Taxans mit Trastuzumab vor [16, 41]. Dabei soll Trastuzumab über eine Therapiedauer von einem Jahr verabreicht werden [16, 42].

Eine relevante Nebenwirkung der Trastuzumab Therapie ist die Kardiotoxizität [16, 40]. Diese bleibt jedoch häufig klinisch stumm und ist in den meisten Fällen reversibel [40].

Lediglich bei gleichzeitiger Kombination der Therapie mit Anthracyclinen steigt das Risiko für kardiale Ereignisse weiter an [16, 40, 43].

Adjuvante Chemotherapie

Die adjuvante Therapie beschreibt die Gabe von Chemotherapeutika im Anschluss an die onkologische Resektion, um potentiell verbleibende, makroskopisch nicht sichtbare Tumorreste zu eliminieren. Die aktuelle S3-Leitlinie definiert drei wichtige Patientengruppen, die postoperativ eine adjuvante Chemotherapie erhalten sollten. Dazu zählen die HER2-positiven Tumore, die triple-negativen Tumoren und Hochrisiko-Luminal-B-Tumoren [16].

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine Polychemotherapie nachweislich die Rezidivraten und das Langzeitüberleben von Brustkrebspatientinnen verbessern kann [16, 44, 45]. Daher stellt aktuell die Kombinationstherapie aus einem Anthracyclin und einem Taxan für 18-24 Wochen das Standard-Chemotherapie-Regime dar [16].

Ein bekannter Vertreter aus der Gruppe der Taxane ist das Paclitaxel. Paclitaxel konnte 1971 aus der Pflanze *Taxus brevifolia* isoliert werden und ist seit seiner Identifikation als Zytostatikum wichtiger pharmakologischer Bestandteil der Tumortheraieforschung [46]. Mikrotubuli sind als Teilungsspindeln Teil der Mitose und spielen außerdem eine Rolle bei der zellulären Formgebung und Bewegung. Über Bindung an die Beta-Tubulin-Untereinheit hemmt Paclitaxel den Abbau der Mikrotubuli [47]. So kommt es über die Bildung von extrem stabilen Mikrotubuli zum Zellzyklusarrest mit Übergang der Zellen in die Apoptose [47].

Auf Grund der beschriebenen Mitosehemmung in allen Körperzellen ist das Nebenwirkungsspektrum von Paclitaxel relativ breit. Die dosislimitierende Nebenwirkung ist die Entwicklung einer Knochenmarksdepression, ungefähr acht bis zehn Tage nach Therapiebeginn [47]. Einhergehend mit schweren Neutropenien kommt es unter anderem auch zu einer erhöhten Infektanfälligkeit. Eine weitere klassische Nebenwirkung ist die Entwicklung einer symmetrischen peripheren Neuropathie, die sich in Form von Taubheitsgefühlen und Kribbelparästhesien an den distalen Extremitäten äußert [47].

Beobachtet wurde zudem auch eine relevante Zahl an Typ-I-Hypersensitivitätsreaktionen, die sich meist innerhalb von zwei bis drei Minuten (min) nach Paclitaxel Aufnahme in Form von Blutdruckabfall, Luftnot und Hauterscheinungen präsentieren [47, 48].

Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthracycline, eine Substanzklasse antibiotisch wirksamer Zytostatika. Der Wirkmechanismus von Doxorubicin in Tumorzellen basiert auf der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Interkalation. Zum anderen führt Doxorubicin über die Inhibition der Topoisomerase II zur Induktion von Strangbrüchen, resultierend im Zelltod [49].

Doxorubicin zeigt starke Nebenwirkungen auf verschiedene tumorunabhängige Organsysteme wie Niere, Leber, Gehirn und besonders relevant das Herz. Im Herzen führt Doxorubicin dosisabhängig über die Produktion freier Radikale zur Schädigung

von Herzmuskelzellen, klinisch ähnlich einer dilatativen Kardiomyopathie [50, 51]. Dabei kann zwischen der akuten und chronischen Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie unterschieden werden [51]. Innerhalb von zwei bis drei Tagen nach Doxorubicin Einnahme kommt es bei ungefähr 11 % der Patientinnen zu einer akuten, reversiblen, kardialen Reaktion, gekennzeichnet durch Brustschmerz und Sinustachykardien [51]. Bei 1,7 % der Patientinnen hingegen kann es innerhalb von 30 Tagen bis zehn Jahren nach letztmaliger Doxorubicin Einnahme zu einer chronischen Schädigung der Herzmuskelzellen kommen [51].

Neoadjuvante Chemotherapie

In der Brustkrebsbehandlung beschreibt die neoadjuvante Therapie eine präoperative Behandlung der Patientinnen mit einem Chemotherapie-Regime. Ziele dieser präoperativen Behandlung sind die Verbesserung der Operabilität über eine Reduktion der Tumormasse und die pathologische Komplettremission (engl: pathologic complete response, pCR) [16, 52]. Diese ist definiert als fehlender histologischer Nachweis von Tumorzellen in Brust- und Lymphknotengewebe.

Die neoadjuvante Chemotherapie sollte laut der aktuellen S3-Leitlinie aus einem Anthracyclin und einem Taxan für 18-24 Wochen bestehen [16]. Bei HER2-Positivität wird die neoadjuvante Behandlung mit Trastuzumab empfohlen. Beim triple-negativen Brustkrebs wird, um die pCR zu erhöhen, der zusätzliche Einsatz von Platinsalzen im Therapieregime empfohlen [16]. Obwohl die Effektivität der neoadjuvanten Chemotherapie nicht an der pCR gemessen werden sollte [53], scheinen laut Leitlinie Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus bei pCR-Raten von 70-80 % am besten auf eine neoadjuvante Therapie anzusprechen [16].

Immuntherapie

Zusätzlich zu den oben genannten Therapieoptionen wird in Studien vermehrt der Effekt einer Immuntherapie in Brustkrebspatientinnen untersucht.

Das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) ist ein Rezeptor an der Oberfläche von B- und T-Zellen und hemmt bei Bindung seines Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) die T-Zell Aktivität im Rahmen der Immunantwort [54].

PD-L1 wird von gesundem Gewebe, aber auch von verschiedenen Tumorentitäten, wie dem Brustkrebs, vermehrt exprimiert [55]. Daraus ergibt sich der neuartige Ansatz einer Verwendung von PD-L1 und PD-1 in der Tumorthherapie als spezifisches Target.

Auf Grundlage der Phase-III-IMpassion130-Studie wird Atezolizumab als monoklonaler Antikörper gegen PD-L1 plus nab-Paclitaxel im metastasierten, PD-L1 exprimierenden TNBC empfohlen [56].

Das Keynote 522-Projekt hat in einer Phase-III-Studie Pembrolizumab, als monoklonalen Antikörper gegen PD-1, plus neoadjuvante Chemotherapie mit der alleinigen Gabe von neoadjuvanter Chemotherapie verglichen [57]. Dabei konnten Vorteile der Immuntherapie mit Pembrolizumab hinsichtlich der pCR gezeigt werden [57].

1.2 Formen der Tumorzellaberrationen

Im Brustgewebe können mehrere pathologische Mechanismen zu malignen Veränderungen der Zellen führen. Dabei unterscheidet man die angeborene Prädisposition für die Entwicklung von Brustkrebs, beispielsweise über autosomal dominant vererbte Genmutationen, von nicht angeborenen epigenetischen Aberrationen.

1.2.1 Genetische Aberrationen

Ungefähr 5-10 % der Brustkrebsfälle sind erblich bedingt [58].

Dabei zählen insbesondere die Tumorsuppressorgene BRCA 1/2 zu den Hochrisiko-Genen für die Entwicklung von Brust- und Ovarialkarzinomen [59]. Das Lebenszeitrisiko bei einer Mutation in diesen Genen bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken liegt bei ungefähr 85 % [59].

Die BRCA 1/2 Mutation spielt insbesondere in Hinblick auf das triple-negative Mammakarzinom eine Rolle. Bei 14,5 % der Patienten der TNBC Patienten konnte eine genetische Mutation nachgewiesen werden, davon lagen ca. 11 % in einem der BRCA Gene und ca. 1,2 % in dem PALP2 Gen [60, 61]. Umgekehrt weisen ca. 57 % der BRCA1 Tumoren einen triple-negativen Subtypen auf [61].

Die Prävalenz einer BRCA 1/2 Mutation bei Geburt liegt bei ca. 0,11 bzw. 0,12 % [58]. Andere genetische Aberrationen, die mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs einhergehen, sind beispielsweise Mutationen in PALP2, BARD1 und RAD51C [62].

Neben den beschriebenen Genen für Brustkrebs gibt es zusätzlich noch eine Reihe von Syndromen, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergehen. Erwähnenswert sind dabei unter anderem das Li-Fraumeni-Syndrom (TP53) oder auch das Cowden-Syndrom (PTEN) [63].

1.2.2 Epigenetische Aberrationen

Epigenetische Aberrationen in der Brustkrebsentstehung, beispielsweise in Form von DNA-Methylierungen, können unter anderem Veränderungen im Wnt- und Hedgehog-(Hh) Signalweg betreffen.

Der Wnt-Signalweg ist ein zellulärer Signaltransduktionsweg, dessen Name sich aus ‚Wg‘ für Wingless und ‚Int-1‘ zusammensetzt [64].

DNA-Methylierungen im Wnt-Signalweg führen zur Stummschaltung von Wnt-Antagonisten und damit zur konsequenten Wnt-Überaktivierung im Brustkrebs [65, 66]. Dadurch kommt es konsequent zu einer Hochregulierung von Beta-Catenin. Beta-Catenin sitzt an der Zelloberfläche und ist unter anderem verantwortlich für die zelluläre Formgebung über die Regulation von Zell-Zell-Kontakten. Zum anderen ist Beta-Catenin als wichtiger Bestandteil der Signaltransduktionskaskade [67] mit Tumorzellproliferation und einem erhöhtem Tumor Stammzellcharakter [68] assoziiert [66].

Eine weitere wichtige epigenetische Aberration im Brustkrebs ist die Veränderung im Hh-Signalweg. Hypomethylierungen des Hh-Liganden führen zu einer Überaktivierung von Hh und somit zu unkontrollierter Zellproliferation [66, 69].

1.2.3 Dysregulierter Metabolismus

Zusätzlich zu den oben beschriebenen genetischen und epigenetischen Veränderungen gibt es Stoffwechselwege im Tumorgewebe, die sich wesentlich von Abläufen in normalen Zellen unterscheiden.

Eine wichtige metabolische Veränderung in Tumorzellen, auch bekannt als Warburg Effekt, ist, dass Tumore, trotz genügend Sauerstoff, Energie hauptsächlich über die anaerobe Glykolyse gewinnen [70]. Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse wird somit vermehrt zu Laktat abgebaut [70]. Laktat wird aus der Zelle transportiert und führt über die Ansäuerung der Tumor-Mikroumgebung zu einer vermehrten Chemotherapieresistenz [71].

Eine weitere metabolische Veränderung in Tumorzellen ist eine Dysregulation des Pentosephosphatwegs (PPW). Der PPW dient dem Abbau von Glucose unter Bildung von NADPH [72]. Es konnte gezeigt werden, dass der PPW in Krebszellen hochreguliert sein kann [72]. Dem Tumor stehen dadurch vermehrt NADPH und Nukleotide für die DNA Synthese zur Verfügung [72].

1.3 Lipidstoffwechsel

1.3.1 Akkumulierung von neutralen Lipiden

In den letzten Jahrzehnten gerät auch der Lipidstoffwechsel als dysregulierter Mechanismus im Brustkrebs zunehmend in den Fokus der Forschung. Der Lipidstoffwechsel im Tumorgewebe weist dabei einige relevante Unterschiede im Vergleich zu gesunden Zellen auf.

Im Tumorgewebe sind Lipide für die Aufrechterhaltung wichtiger Funktionen wie Membranstabilität und Proliferation unverzichtbar [73]. Dabei haben Tumorzellen zwei Möglichkeiten, sich die notwendigen Lipide zu beschaffen. Sowohl über die vermehrte extrazelluläre Aufnahme von Lipiden als auch über die intrazelluläre Synthese ist die Aufrechterhaltung des Tumor-Lipidstoffwechsels möglich [73, 74].

Tumorzellen, die den Weg der intrazellulären Lipidsynthese nutzen, werden unter dem Begriff des lipogenetischen Phänotyps zusammengefasst [75]. Die de novo Synthese von Fettsäuren aus Acetyl-Coenzym A (CoA) und Malonyl-CoA wird in den Zellen durch die Fettsäure-Synthase (FAS) katalysiert [75, 76]. Dabei werden dann die endogen synthetisierten Lipide zu Phospholipiden verestert, um als Membranbestandteil in die Tumorzellen eingebaut zu werden [75, 76].

Die Relevanz von FAS im Brustkrebs unterstreicht eine Studie, die zeigt, dass die erhöhte FAS Expression mit dem Rezidivrisiko korreliert [77]. Zudem scheint sie assoziiert mit einer vermehrten Chemotherapieresistenz [78], sodass die FAS ein potentiell neues Target in der Brustkrebsbehandlung sein könnte [75].

Tumorzellen, die hingegen eine verstärkte exogene Lipidaufnahme zeigen, werden auch als Lipid-akkumulierender-Phänotyp bezeichnet [73]. Lipide sind wasserunlöslich

und werden im Blutkreislauf daher an Lipoproteine gebunden und transportiert. Die Lipoproteinlipase spaltet die in den Lipoproteinen enthaltenen neutralen Lipide, Triglyceride (TAG) und Cholesterinester (CE), die dann von der Zelle über das Oberflächenprotein CD36 aufgenommen werden können [79]. In Brustkrebszellen konnte eine erhöhte Expression der Lipoproteinlipase nachgewiesen werden [80].

Die einzelnen Brustkrebs Subtypen, s. Kapitel 1.1.2, zeigen unterschiedliche Ausprägungen und Mechanismen, um ihren Lipidstoffwechsel aufrechtzuerhalten. Die erhöhte exogene Aufnahme und Verwertung neutraler Lipide konnte vor allem in TNBC-Zellen beobachtet werden [81]. Im Vergleich zu Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen zeigen sie einen deutlich höheren Gehalt an intrazellulären Lipidtropfen (engl.: Lipid Droplets, LD) [81]. Zudem konnte in TNBC-Zellen eine erhöhte Aktivität der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT), die zur Veresterung von Cholesterin und Fettsäuren führt, nachgewiesen werden [81].

Eine im TNBC erhöhte Expression des Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Rezeptors an der Zelloberfläche ist gleichzeitig verbunden mit einer erhöhten LDL-Aufnahme. Hohe LDL-Konzentrationen im Tumor sind mit einer verstärkten Zellproliferation assoziiert und tragen so zum hohen Aggressivitätspotential des TNBC bei [82].

1.3.2 Zelluläre Verwertung der neutralen Lipide

Nach Aufnahme und Akkumulation der Lipide durch den Tumor können diese als TAGs und CEs in Form von sogenannten Lipidtropfen gespeichert und bei Bedarf weiterverwertet werden [83].

Obwohl der genaue Mechanismus der LD-Bildung noch unklar scheint, können LDs entweder de novo oder durch Spaltung bereits existierender Lipidtropfen gebildet werden [83]. Ort der Bildung scheint das endoplasmatische Retikulum zu sein [84]. Die Grundvoraussetzung für die Bildung ist die Synthese von neutralen Lipiden, also durch Veresterung von freien Fettsäuren und Cholesterin am endoplasmatischen Retikulum. Die veresterten Lipide akkumulieren zwischen den Schichten des endoplasmatischen Retikulums und formieren sich dann bei steigenden Lipidkonzentrationen zu einer LD-Vorstufe, den sogenannten Lipidlinsen [83]. Ab einer bestimmten Größe verschmelzen diese Lipidlinsen an der Oberfläche in einem letzten Schritt zu Lipidtropfen [83].

LDs sind elektronenmikroskopisch runde Strukturen, umgeben von einer Phospholipid-Monoschicht [85]. Ihre Größe variiert je nach Menge der gespeicherten Lipide zwischen 0,1 und 10 Mikrometer (μm). Im Fettgewebe sind sogar Größen bis zu 100 μm möglich [86].

In einem Case Report von 1963 wurden LDs zum ersten Mal in einer 59-jährigen Frau mit Morbus Paget der Mamille beschrieben [87] und konnten seitdem in verschiedenen Tumorentitäten, wie Lunge, Zervix und Kolon, nachgewiesen werden [88].

Bei Bedarf durch die Zelle werden die neutralen Lipide durch zwei Mechanismen, die Lipolyse und die Lipophagie, aus den Lipidtropfen rekrutiert. Die Lipolyse katalysiert durch die Adipozyten-Triglycerid-Lipase und die hormonsensitive Lipase die Hydrolyse

von Triglyceriden, die der Zelle dann wieder als Energielieferanten zur Verfügung stehen [89].

Die Autophagie hingegen beschreibt den Abbau zellulärer Bestandteile und wird auch als Selbstverdauungs-Prozess der Zelle zusammengefasst. In sogenannten Autophagosomen werden Zellbestandteile aufgenommen und nach Fusion mit dem Lysosom durch Hydrolasen aufgelöst und verdaut [90, 91]. Die Lipophagie als spezielle Unterform der Autophagie beschreibt den Prozess der Degradierung von LDs [92]. Dabei kann die Makro- von der Mikrolipophagie unterschieden werden [91]. Die Makrolipophagie meint den Abbau von Lipidtropfen, ähnlich der Autophagie, nach Fusion von LD enthaltenden Autophagosomen mit dem Lysosom [91]. Im Gegensatz dazu ist die Mikrolipophagie die direkte Interaktion zwischen Lysosomen und LDs [91].

1.3.3 Einfluss auf den Tumorstammzellcharakter

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung [93]. Auf Grund dieser zwei zentralen Funktionen stehen Stammzellen in den letzten Jahrzehnten zunehmend im Fokus der Tumorentstehung und -entwicklung [93].

Auch in der Brust tragen die Tumorstammzellen (engl: breast cancer stem cell, BCSC) entscheidend zur Tumorprogression, Metastasierung und Resistenzentwicklung bei [94]. Im Vergleich verschiedener Brustkrebszelllinien konnten insbesondere im TNBC erhöhte BCSC-Populationen nachgewiesen werden [95], aber auch in Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen wurde ein erhöhter Stammzellanteil gefunden [33].

Zur Charakterisierung der Tumorstammzellen im Brustkrebs dienen typische Stammzellmarker wie das CD44/CD24-Verhältnis und die Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1).

Das CD44-Antigen ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche und ein Rezeptor für Hyaluronsäure [96]. In vielen Krebszellen überexprimiert spielt es vor allem bei Zelladhäsionen, Proliferation und Differenzierung eine Rolle [97, 98]. Das CD24-Antigen ist ein glykosyliertes Protein der Zelloberfläche und wird über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker in vielen Krebszellen, wie Brust, Niere und Lunge, befestigt [98, 99]. Im Brustkrebs wird vor allem der CD44⁺/CD24^{-low}-Phänotyp als Stammzellmarker exprimiert [98, 100].

Das ALDH1-Isoenzym gehört zur großen Gruppe der Aldehyd-Dehydrogenasen, die in unterschiedlichen Körpergeweben die Oxidation von Aldehyd-Substraten katalysieren [101]. Über die Oxidation von Retinol zu Vitamin-A-Säure trägt ALDH1 zur Differenzierung und Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von BCSCs bei [101]. ALDH1 wurde als relevanter Stammzellmarker sowohl in Stammzellen des normalen Brustgewebes als auch in BCSCs gefunden [102].

Eine weitere wichtige Beobachtung in Bezug auf die Tumorstammzellen ist die Verbindung zum Lipidstoffwechsel. Fettsäuren scheinen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters in Brustkrebszellen zu spielen [103]. So

führt eine Hemmung im Signaltransduktionsweg JAK/STAT des Lipidstoffwechsels über eine Hemmung der Beta-Oxidation zu einer Verminderung des Stammzellcharakters [103].

Zudem konnte festgestellt werden, dass die Höhe der BCSCs mit der Zahl an Lipidtröpfchen korreliert [104].

1.4 Lysosomale saure Lipase

1.4.1 Bedeutung der sauren Lipase im Lipidstoffwechsel

Die Lysosomale saure Lipase (engl.: *lysosomal acid lipase*, LAL) hydrolysiert die über Endozytose aufgenommenen CEs und TAGs [105]. Das dabei entstehende freie Cholesterin dient unter anderem als essentieller Bestandteil von Zellmembranen und als Vorstufe von Steroidhormonen. Ein Überschuss an freiem Cholesterin kann am endoplasmatischen Retikulum über die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase wieder zu neutralen Lipiden verestert werden und wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben in Form von Lipidtröpfchen gespeichert werden [106], s. Abbildung 1.1. Die durch die LAL freigesetzten freien Fettsäuren stellen über ihren Abbau in der Beta-Oxidation eine wichtige Energiequelle dar [107].

1.4.2 Potential in der Antitumor-Therapie

Die Relevanz des Lipidmetabolismus für Proliferation und Überleben von Tumoren eröffnet neue therapeutische Möglichkeiten unter Identifikation neuer spezifischer Targets in der Brustkrebstherapie.

Ein möglicher Ansatz ist die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase. In ersten Studien konnte im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs ein reduziertes Rezidivrisiko unter adjuvanter Statin-Gabe festgestellt werden [108], [109]. Im TNBC hingegen konnte bislang kein Vorteil von Statinen auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden [110]. Aktuelle Studien untersuchen zudem die Inhibition des LDL-Rezeptors und der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase, um die Aufnahme und Akkumulation exogener Lipide zu blockieren. Es konnte gezeigt werden, dass die ACAT als Angriffspunkt über Hemmung der Veresterung im TNBC zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären Lipidakkumulation und damit einem verminderten Tumorwachstum führt [111].

Da die saure Lipase derzeit das einzig bekannte Enzym ist, das Lipide im Lysosom hydrolysiert und für die Zelle verwertbar macht, s. Kapitel 1.4.1, stellt auch die LAL ein potentiell Target in der Tumorthherapie dar. Eine neuartige therapeutische Möglichkeit in der Brustkrebstherapie basiert auf der spezifischen Inhibition der lysosomalen sauren Lipase mit dem Lipasehemmer Lalistat 2.

Die Verwendung von Lalistat in der Antitumor-Therapie wurde in der Literatur noch nicht oft beschrieben. Bisher wurde Lalistat 2 beispielsweise im experimentellen Rahmen zur Messung der LAL-Aktivität in Trockenblut bei lysosomalen Speichererkrankungen, wie z.B. der Wolman-Krankheit, genutzt [112]. In LAL-

defizienten Mausmodellen konnten mangels resultierender zellulärer Fähigkeit der Lipidspaltung und -verarbeitung eine massive Einlagerung von Lipiden in Leber und Nebenniere beobachtet werden [113].

Orlistat als Breitband-Lipaseinhibitor findet dagegen aktuell hauptsächlich Verwendung in der Adipositas Behandlung [114]. Allerdings zeigte auch Orlistat bereits Potential in der Antitumor-Therapie [115]. Über die zelluläre Blockade der Fettsäure-Synthese konnte eine Reduktion der Tumorzellproliferation im HER2-positiven Brustkrebs beobachtet werden [115].

Basierend auf den oben genannten Erkenntnissen wurde in vorherigen wissenschaftlichen Arbeiten Lalistat 2 genutzt, um die Inhibition der LAL-Enzymaktivität in unterschiedlichen Brustkrebs-Zelllinien zu untersuchen.

Die Inhibition des Enzyms führt über die Hemmung des intrazellulären Lipidstoffwechsels zu einer Akkumulation von neutralen Lipiden in den Zellen [116]. In Kombination mit Paclitaxel erhöhte Lalistat signifikant und dosisabhängig die Apoptose Induktion in TNBC-Zellen [116]. In Bezug auf den Tumorstammzellcharakter in TNBC-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der sauren Lipase zu einer signifikanten Reduktion von Stammzellmarkern, insbesondere CD44/CD24 und ALDH1, führte [116].

Die Ergebnisse zeigen die potentielle Bedeutung der sauren Lipase als individuelles Target in der Brustkrebstherapie.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Liu et al. 2022 wurde der sauren Lipase unabhängig von ihrer Lipasefunktion eine Proteinfaltungsfunktion im Tumorzell-Metabolismus zugeschrieben, die die LAL als potentielles Therapieziel beim TNBC weiter in den Mittelpunkt rückt [117].

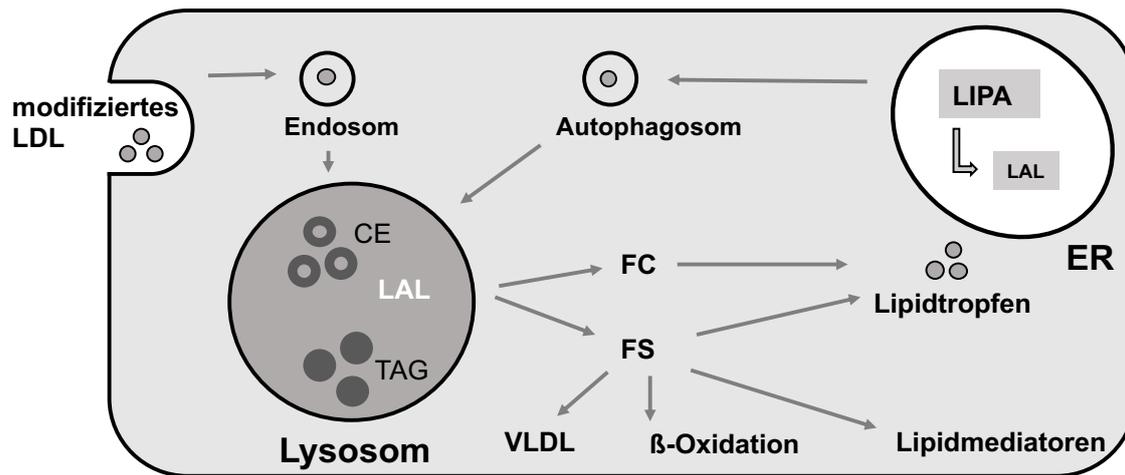


Abbildung 1.1: Darstellung des intrazellulären Lipidstoffwechsels

LDL, ggf. bei einem längeren Verbleib in der Blutzirkulation chemisch modifiziert (oxLDL), wird über LDL-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen. Die transportierten Cholesterinester (CE) und Triglyceride (TAG) werden in das Lysosom aufgenommen und dort von der lysosomalen sauren Lipase (LAL) zu Fettsäuren (FS) und freiem Cholesterin (FC) hydrolysiert. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden diese anschließend durch die Acetyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) verestert, um dann in sogenannten Lipidtropfen in der Zelle gespeichert zu werden (basierend auf Zhang et al., 2018, Abb. 1) [118].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Brustkrebs gerät der veränderte Lipidmetabolismus in Tumorzellen zunehmend in den Fokus. Sowohl im TNBC als auch im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs konnte eine erhöhte zelluläre Aufnahme / Synthese neutraler Lipide zur Aufrechterhaltung wichtiger Tumorfunktionen beobachtet werden.

Die lysosomale saure Lipase hydrolysiert die ins Lysosom aufgenommenen neutralen Lipide zu freien Cholesterinen und Fettsäuren und ist aktuell das einzig bekannte Enzym, das die Lipide für die weitere Verwertung durch die Zelle bereitstellt. Der beschriebene Prozess macht die saure Lipase somit als potentiell Target in der adjuvanten Brustkrebstherapie interessant.

Diese Arbeit soll mit Hilfe von drei verschiedenen Ansätzen die Nutzungsmöglichkeiten der Lipaseinhibition mit Lalistat 2 in der adjuvanten Brustkrebstherapie untersuchen.

Doxorubicin

Der erste Ansatz zur Nutzung der Lipasehemmung in der adjuvanten Brustkrebstherapie konzentriert sich auf die Anthracycline. Doxorubicin ist in Kombination mit Paclitaxel fester Bestandteil der adjuvanten Systemtherapie im Brustkrebs. Im klinischen Alltag stellt dabei unter anderem die dosislimitierende Kardiotoxizität von Doxorubicin ein Problem dar. Eine potentielle Dosisreduktion von Doxorubicin zur Minimierung von Nebenwirkungen durch adjuvante Verstärkung der

Doxorubicin-induzierten Apoptose und Antiproliferation durch Lalistat soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Paclitaxel

In Zellkulturversuchen konnte für die Kombination aus Lalistat und Paclitaxel bereits eine erhöhte Apoptoseinduktion im triple-negativen Brustkrebs nachgewiesen werden [116]. Leitliniengerecht ist Paclitaxel jedoch oft über einen mehrmonatigen Zeitraum von 18-24 Wochen Bestandteil der adjuvanten Systemtherapie im TNBC. Um die Effekte von Lalistat auf bereits behandelte Brustkrebszellen zu untersuchen, soll in dieser Arbeit ein Paclitaxel-langzeitbehandeltes TNBC-Zellmodell entwickelt werden, um anschließend die adjuvante Lipasehemmung an diesem Modell untersuchen zu können.

Tamoxifen

Die endokrine Therapie beim Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs besteht aus der adjuvanten Gabe von Aromatasehemmern oder Tamoxifen über mindestens fünf Jahre. Therapielimitierend im klinischen Alltag ist hierbei oft die Resistenzentwicklung gegen Tamoxifen.

Um eine potentielle Nutzung von Lalistat auch im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs zu ermöglichen, soll in dieser Arbeit die Wirkung von Lalistat auf Tamoxifen, insbesondere in Tamoxifen-resistenten Zellen, untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Destilliertes Wasser	VWR International, Radnor, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F-12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol 70 %	VWR International, Radnor, USA
Fetales Bovines Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin Streptomycin (Pen/Strep) 10.000 Units/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypan Blau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA 0,5 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tabelle 2.2: Übersicht der Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	Inhalt
RPMI Medium 1640	+ L-Glutamin + Phenolrot

	+ 15 % FCS + 1 % PenStrep
DMEM/F-12 mit Tamoxifen	+ L-Glutamin + 15 Millimolar (mM) HEPES - Phenolrot + FCS 1 % + 6 µg/ml Insulin + 1 Mikromolar (µM) Tamoxifen
DMEM/F-12	+ L-Glutamin + 15 mM HEPES - Phenolrot + FCS 1 % + 6 µg/ml Insulin

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser (ø 13 mm)	VWR International, Radnor, USA
Einwegpipetten 5/10/25 ml	Corning Incorporated, New York, USA
Filterpipettenspitzen TipOne®	Starlab, Hamburg, DEU
Glaspipetten (ca. 225 mm)	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, DEU
Mikrotiterplatten 6/12/96 Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Mikrotiterplatten 384 Well	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Neubauer Zählkammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitrilhandschuhe	Ansell, Richmond, AU
Papiertücher	Sofidel Group, Porcari, ITA
Parafilm	Bemis Company, Neenah, USA
Polypropylen-Röhrchen 15 / 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Polypropylen-Einmalgefäße 0,5 / 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DEU

Reagenzreservoirs 25 ml	VWR International, Radnor, USA
RNase-Dekontaminationslösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Staubfreie Papiertücher	Kimberly-Clark, Irving, USA
Zellkulturflaschen (T-25, T-75, T-175)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT

2.4 Wirkstoffe

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Wirkstoffe

Substanzname	Hersteller
Doxorubicin	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
Lalistat 2 (Cat. No. 6099)	Tocris Bioscience, Bristol, GBR
NeoTaxan® (Paclitaxel)	Hexal AG, Holzkirchen, DEU
Tamoxifen	Cayman Chemical Company, Michigan, USA

2.5 Zelllinien

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Brustkrebszelllinien

Zelllinie	Hersteller
MCF-7	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, DEU
MCF-7 / TamR-1	Merck, Darmstadt, DEU
MDA-MB-231	LGC Standards GmbH, Wesel, DEU

2.6 Geräte und Gegenstände

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Laborgeräte und Gegenstände

Gerät/Gegenstand	Hersteller
Absaugsystem für Zellkultur	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DEU
Autoklav	Systec, Linden, DEU
Brutschrank Modell HERAccl® 150i	VWR International, Radnor, USA
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen, DEU
Kreisschüttler Köttermann®	Beyer-Enders, Düsseldorf, DEU
Kühlschrank	Liebherr-International AG, Bulle, CHE
Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, DEU
Mikrotiterplatten-Lesegerät Spark®	Tecan Group AG, Männedorf, CHE
Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop® 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrozentrifuge, MiniStar silverline	VWR International, Radnor, USA
Multikanalpipette 12-Kanal „Finnpipette“	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Notebook	Dell Technologies, Round Rock, USA
PCR Plattform LightCycler® 480	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CHE
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Pipettierhilfe „Accurpette“	VWR International, Radnor, USA
Sterilbank	LaboGene, Allerød, DK
Stickstoff-Lagerungstank	Air Liquide, Paris, FRA
Taschenrechner	Lyreco, Marly, FRA
Tischzentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DEU
Universalzentrifuge Megafuge®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, DEU

Vortexmischer	VWR International, Radnor, USA
Wasserbad	LAUDA-GFL, Burgwedel, DEU
Zellschaber	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT

2.7 Software

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Software

Software	Hersteller
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Microsoft® Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 9	Graph Pad Software, San Diego, USA

2.8 Kommerzielle Testkits

Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten kommerziell erhältlicher Testkits

Testkit	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corporation, Madison, USA
CellTox® Green Cytotoxicity Assay	Promega Corporation, Madison, USA
ReliaPrep® RNA Cell Miniprep System	Promega Corporation, Madison, USA

2.9 Primer

Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Primer und Sequenzen für die Real-Time PCR

Die abgebildete Tabelle zeigt die in der Real-Time PCR verwendeten Primer inklusive entsprechender Sequenz (5' – 3') und Hersteller.

Primer	Sequenz (5' - 3')	Hersteller
ALDH (2) for	TCTCGACAAAGCCCTGAAGT	Metabion, Planegg, DEU
ALDH (2) rev	GGCGTTGTAGCAGTTGATCC	
CD24 for	ATGGGCAGAGCAATGGTG	Metabion, Planegg, DEU
CD24 rev	CCAGTTGTTGTTTCACTGGAAT	
CD44 (1) for	TTTCTTCAACCCAATCTCACAC	Metabion, Planegg, DEU
CD44 (1) rev	GCTGAAGCGTTATACTATGACTGG	
E-Cadherin for	CTTTGACGCCGAGAGCTACA	Eurofins Genomics, Ebersberg, DEU
E-Cadherin rev	TCGACCGGTGCAATCTTCAA	
ESR1 for	CCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGG	Eurofins Genomics, Ebersberg, DEU
ESR1 rev	GTTTTTATCAATGGTGCACTGG	
GAPDH for	TGCACCACCAACTGCTTAGC	Eurofins Genomics, Ebersberg, DEU
GAPDH rev	CCCGCGGCCATCACG	
HPRT1 for	TGACACTGGCAAACAATGCA	Eurofins Genomics, Ebersberg, DEU
HPRT1 rev	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	
MYC for	GCTGCTTAGACGCTGGATTT	Metabion, Planegg, DEU
MYC rev	TAACGTTGAGGGGCATCG	
PDL1 for	GGCATCCAAGATACAACTCAA	Metabion, Planegg, DEU
PDL1 rev	CAGAAGTTCCAATGCTGGATTA	

Vimentin (2) for	AGAGGAAGCCGAAAACACCC	Eurofins Genomics, Ebersberg, DEU
Vimentin (2) rev	TCAAGGTCAAGACGTGCCAG	

ALDH: Aldehyd-Dehydrogenase. ESR: Östrogenrezeptor, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HPRT1: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, PDL 1: Programmed Cell Death Ligand 1, for: forward, rev: reverse.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen bei flüssigem Stickstoff gelagerten Aliquots wurden zum Auftauen zunächst gründlich mit Ethanol abgewischt, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Die Röhrchen wurden zügig im Wasserbad bei 37 Grad Celsius (°C) erwärmt und die aufgetaute Zellsuspension unter der Sterilbank in ein 15 ml Falcon überführt. Langsam wurden 10 ml des vorgewärmten Mediums zu der Zellsuspension hinzugegeben, vorsichtig resuspendiert und für 5 min bei 1100 revolutions per minute (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in zirka (ca.) 2-3 ml Medium vollständig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann zunächst in eine T-25 Zellkulturflasche überführt und mit weiteren 5 ml Medium aufgefüllt. Diese wurde dann im Brutschrank mit 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig am Boden der Zellkulturflasche angewachsen waren.

3.1.2 Kultivierung von Zellen

Zur Beurteilung von Zustand und Wachstumsverhalten der Zellen wurden sie täglich unter dem Mikroskop betrachtet. Bei einer Konfluenz von 80-90 %, ungefähr jeden 3.-4. Tag, wurden die Zellen wie folgt gesplittet.

Nachdem alle benötigten Materialien im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt wurden, wurden die Zellen unter der sterilen Werkbank für 1-2 min mit PBS Lösung gewaschen, Menge s. Tabelle 3.1. Zur Lösung der Zellen vom Flaschenboden wurde flaschengrößenadaptiert, s. Tabelle 3.1, Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C für 5 min inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde Medium zugegeben, s. Tabelle 3.1, und die Lösung wiederholt über den Flaschenboden pipettiert. Im Verhältnis 1:6 wurde die Suspension in ein 15 ml Falcon pipettiert. Die Zellkulturflasche wurde zur weiteren Kultivierung je nach Größe wieder mit Medium aufgefüllt. Das 15 ml Falcon wurde für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert und mit 9 ml frischem Medium aufgefüllt.

Tabelle 3.1: Mengenschema zur Zellkultivierung je nach Größe der Zellkulturflasche

Flaschengröße	PBS (ml)	Trypsin-EDTA (ml)	Medium (ml)
T-25	7	1	5
T-75	12	1,2	10,8
T-175	15	2	10

Angabe aller Mengen in ml. PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure.

MDA-MB-231 Zellen

Die MDA-MB-231 Zelllinie entspricht dem triple-negativen Phänotyp und stammt ursprünglich von einer 51-jährigen Frau mit metastasiertem Adenokarzinom der Brust [119]. Kultiviert wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C in RPMI-1640 Medium mit 15 % FCS und 1 % PenStrep.

MCF-7 Zellen

Die MCF-7 Zelllinie, kurz für Michigan Cancer Foundation 7, gilt als Zellmodell für den Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs und stammt ursprünglich von einer 69-jährigen kaukasischen Frau [120].

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den MCF-7 / TamR-1 Zellen wurden die MCF-7 Zellen in DMEM/F-12 Medium mit L-Glutamin, 15 mM HEPES Puffer, 1 % FCS und 6 ng/ml Insulin kultiviert.

MCF-7 / TamR-1 Zellen

Die Tamoxifen-resistente Zelllinie wurde kommerziell bei Merck KGaA, Darmstadt erworben und nach Herstellerprotokoll bei 37 °C in DMEM/F-12 Medium mit L-Glutamin, 15 mM HEPES Puffer, 1 % FCS, 6 ng/ml Insulin und 1 µM Tamoxifen kultiviert.

3.1.3 Zählen der Zellen

Vor der Zellzählung wurden die Zellen zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Davon wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gemischt. Die Suspension wurde mit Hilfe einer Pipette auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Diese wurde zuvor mit destilliertem Wasser und staubfreien Papiertüchern gereinigt.

Unter dem Mikroskop wurden im 10x Objektiv mit 100x absoluter Vergrößerung die 4 Kammern mit Hilfe einer Zähluhr ausgezählt. Die Zellzahl wurde anschließend mit folgender Formel berechnet: $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$ Zellen/ml.

3.1.4 Aussäen der Zellen

Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Zellen zentrifugiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

Anschließend wurden die Zellen auf eine Dichte von $6,5 \cdot 10^5$ /ml mit der Formel: Zelldichte = Soll/Haben * Volumen eingestellt. Die Zellsuspension wurde in Mikrotiterplatten mittels einer Pipette ausgesät, 96-Well-Platten mit einem Volumen von 100 µl/Well und 384-Well-Platten mit einem Volumen von 40 µl/Well. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mehrmals in horizontaler und vertikaler Richtung geschwenkt, um ein festes und gleichmäßiges Anwachsen der Zellen auf dem Plattenboden zu gewährleisten.

3.1.5 Einfrieren von Zellen

Vor dem Einfrieren der Zellen wurde zunächst das Einfriermedium aus 100 % FCS und 10 % DMSO vorbereitet. Die Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und als Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 7 min bei 700 x g zentrifugiert und der Medium-Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ /ml eingefroren. Dafür wurde das Zellpellet mit der entsprechenden Menge an Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Pipette auf Kryoröhrchen aufgeteilt und diese bei -80 °C eingefroren.

3.2 Doxorubicin

3.2.1 Adjuvante Effekte der sauren Lipase Inhibition auf MDA-MB-231 Zellen

Die Zellen wurden wie in 3.1.4 beschrieben in 96-/384-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden (h) wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig am Boden der Platte angewachsen sind. In einem 15 ml Falcon wurde Medium mit Lalistat und DMSO als Kontrolle in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 25, 50 µM) angesetzt und für 5 Sekunden (s) gevortext. Das alte Medium der Mikrotiterplatte wurde vorsichtig abgenommen, während die Zellen am Boden der Platte verblieben. Neues Medium wurde, in drei Reihen, beginnend in Zeile B (Lalistat) und Zeile E (DMSO) der Mikrotiterplatte mit einem Volumen von 100 µl zugegeben. Anschließend wurde die Platte für 72 h bei 37 °C inkubiert und täglich das Zellwachstum unter dem Mikroskop kontrolliert.

Nach 3 Tagen wurden eine Verdünnungsreihe mit 400 µM Doxorubicin angesetzt. Beginnend in Spalte 2 einer 96-Well-Platte wurde Doxorubicin im Verhältnis 1:2 auf einen neuen Lalistat/DMSO-Ansatz titriert. Spalte 1 und 12 dienen als Mock-Behandlung. Je 100 µl der Verdünnungsreihe wurden auf die präinkubierten Zellen gegeben. Nach weiteren 6 Tagen Inkubation unter täglicher mikroskopischer Kontrolle

wurde dann die mittlere inhibitorische Konzentration mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen, s. 3.2.2.

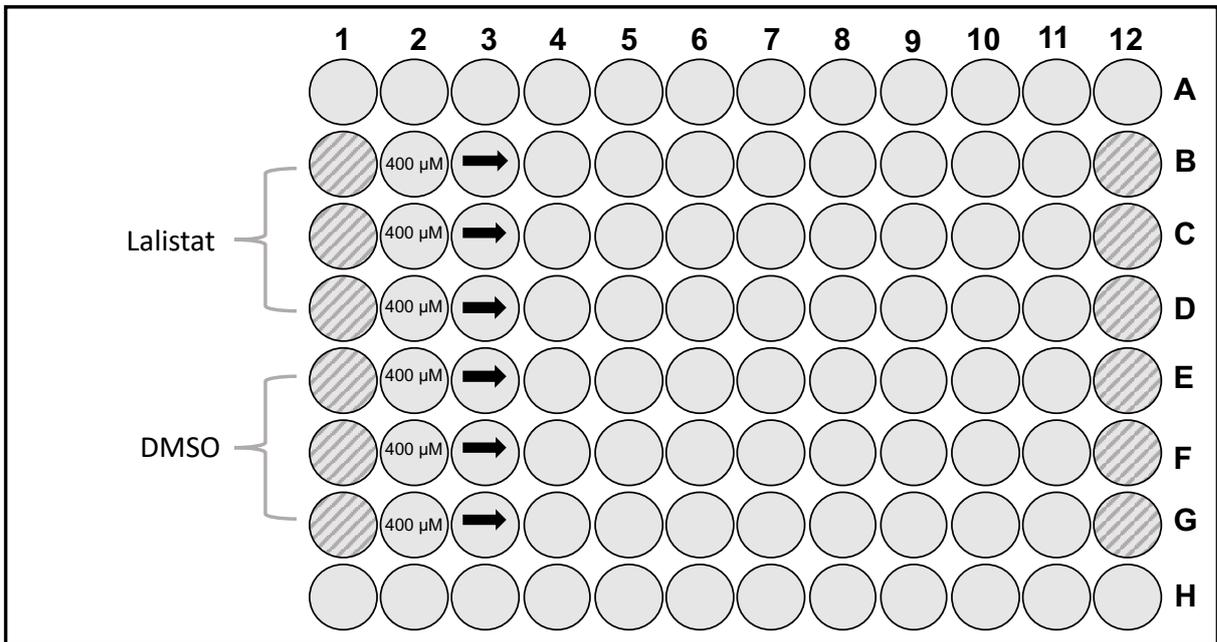


Abbildung 3.1: Schema zum Versuchsaufbau zur Messung adjuvanter Effekte von Lalistat auf MDA-MB-231 Zellen

Zur Veranschaulichung wird hier der Versuchsaufbau in einer 96-Well-Platte dargestellt. Die Zellen wurden in Reihe B-G in einer Dichte von $6,5 \cdot 10^5$ /ml ausgesät und nach 24 h für 3 Tage mit Lalistat/DMSO präinkubiert. Im Anschluss erfolgte eine sechstägige Inkubation mit 400 µM Doxorubicin als Verdünnungsreihe, beginnend in Spalte 2. Schraffiert: Mock-Behandlung.

3.2.2 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Nachdem die Zellen wie in 3.2.1 beschrieben behandelt wurden, wurde mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay die Viabilität der behandelten Zellen gemessen. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Quantifizierung von Adenosintriphosphat (ATP) über Erzeugung eines lumineszenten Signals [121]. Die ATP-Konzentration als Zeichen für metabolisch aktive Zellen ist äquivalent zur Anzahl der noch lebendigen Zellen [121].

Zur Vorbereitung der Messungen wurden jeweils 10 ml CellTiter-Glo® Puffer bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einem Fläschchen CellTiter-Glo® Substrat gemischt [121]. In einem 1:1 Verhältnis wurde das RPMI Medium 1640 mit der CellTiter-Glo® Lösung gemischt. 40 µl (384-Well-Platte) und 50 µl (96-Well-Platte) der CellTiter-Glo® Lösung wurden in die einzelnen Wells pipettiert. Pro Platte wurden jeweils 2 zellfreie Wells gemessen, um die Hintergrund Lumineszenz rauszurechnen [121]. Bei Raumtemperatur wurde die Platte für 10 min auf dem Kreisschüttler im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte dann im Mikrotiterplattenphotometer [121].

3.2.3 CellTox® Green Cytotoxicity Assay

Um die adjuvanten Effekte der Lipaseinhibition auf die Anthracyclin-induzierte Antiproliferation zu messen, wurde der CellTox® Green Cytotoxicity Assay verwendet. Dabei wird ein DNA-bindender Farbstoff genutzt, der über Defekte in der Zellmembran an die Zell-DNA bindet [122]. Bei der Bindung werden die fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffs aktiviert. Damit ist die Intensität des fluoreszierenden Signals proportional zur Anzahl der toten Zellen [122].

In einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ /ml wurden MDA-MB-231 Zellen in einer 384-Well-Platte mit 40 µl/Well ausgesät. Nach 24 h wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig am Boden der Platte angewachsen sind und anschließend für sechs Tage mit 25 und 50 µM Lalistat und einer Verdünnungsreihe mit 780 nM Doxorubicin inkubiert. Wie im Herstellerprotokoll angegeben wurden dann 10 µl des aufgewärmten CellTox® Green Farbstoff pro 5 ml Zellen in einer Verdünnung von 1:500 gemischt und jeweils 40 µl (384-Well-Platten) und 50 µl (96-Well-Platten) der Lösung in die Wells pipettiert [122]. Vor der Messung im Mikrotiterplattenphotometer wurde die Platte für 15 min lichtfrei inkubiert [122].

3.3 Paclitaxel

3.3.1 Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten Zelllinie

Um eine Langzeit-Paclitaxel behandelte Zelllinie zu entwickeln, wurde die Zelllinie MDA-MB-231 mit zunehmenden Konzentrationen Paclitaxel über einen Zeitraum von ungefähr sieben Monaten inkubiert. Die Paclitaxel-Konzentration startete bei 1,5 nM Paclitaxel. Nach jeweils 3 Tagen wurde das Paclitaxel von den Zellen entfernt und diese zweimal mit PBS gespült, um alle Paclitaxel Rückstände vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen zur Erholung für vier Tage ohne Paclitaxel inkubiert. Dieser Zyklus wurde jeweils für zwei bis drei Wochen wiederholt, bevor die Paclitaxel-Konzentration um das 1,5-fache erhöht wurde. Die Konzentration wurde insgesamt achtmal bis zu einer Konzentration von 25 nM Paclitaxel erhöht. Als finale Paclitaxel-Konzentration wurde 35 nM gewählt. Parallel zu der Paclitaxel Zelllinie wurde eine Kontrolle mit MDA-MB-231 Zellen gehalten, die jeweils zweimal die Woche in einem Passageverhältnis von 1:6 gesplittet wurde. Mangels vorhandener spezifischer Literatur erfolgte die Entwicklung der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen in Anlehnung an Protokolle zur Entwicklung einer resistenten Zelllinie [123, 124]. Daher wurde, um die mögliche Resistenzbildung auszuschließen, die IC_{50} mit dem in 3.2.2 beschriebenen CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen. Zusätzlich wurden Fotos von den behandelten Zellen gemacht.

3.3.2 Isolieren von Zellklonen

Um anschließend eine homogenere Zellpopulation zu erhalten und um die IC_{50} -Werte der gezüchteten Zelllinie zu präzisieren, wurden verschiedene Zellklone der Zelllinie

gepickt. Dafür wurden die Zellen gezählt und mit insgesamt 80 Zellen auf 10 ml in einer 96-Well-Platte ausgesät, je 100 μ l / Well. Unter täglicher mikroskopischer Kontrolle der Zellen wurden die Wells mit Wachstum eines singulären Zellklons markiert. Nach etwa 2 Wochen wurden 7 der 96 Wells mit morphologisch veränderten Zellklonen für eine weitere Woche in einer 12-Well-Platte inkubiert, bevor sie in T-25 Zellkulturflaschen überführt wurden. In diesem Prozess haben drei der ursprünglich sieben Zellklone überlebt, bezeichnet nach Lokalisation in der 12-Well-Platte, „A1“, „A3“ und „B1“.

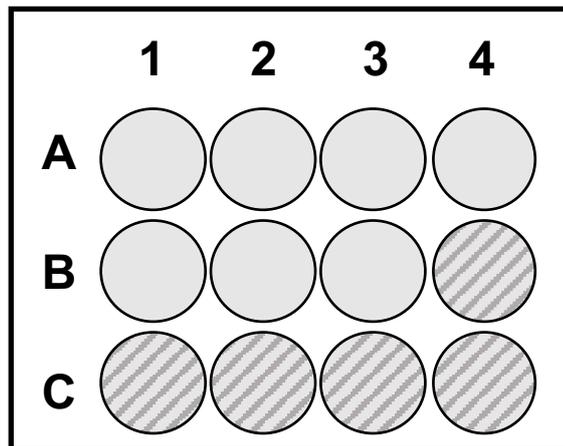


Abbildung 3.2: Versuchsaufbau der 12-Well-Platte zur Isolierung einzelner Zellklone der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zelllinie

Die Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellpopulation wurde zunächst mit 80 Zellen auf 10 ml in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Wells mit Wachstum eines singulären Zellklons wurden markiert und nach etwa 2 Wochen in eine 12-Well-Platte umgesiedelt.

3.3.3 Proliferationstestung der Zellklone

Um die drei Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellklone „A1“, „A3“ und „B1“ näher zu charakterisieren, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellklone über 72 h beobachtet.

Die Zellklone und MDA-MB-231 Zellen als Kontrolle wurden untereinander in je eine Reihe einer 96-Well-Platte in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ /ml ausgesät. Nach 3 Stunden wurde zum ersten Mal mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, s. Kapitel 3.2.2, die Zellviabilität bestimmt. Dabei wurden je 2 Wells einer Reihe gemessen. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Messung nach beschriebem Schema wiederholt.

3.3.4 Adjuvante Effekte der sauren Lipase Inhibition auf die Zellklone

Um den adjuvanten Effekt der sauren Lipaseinhibition mit Lalistat auf die Zellklone zu untersuchen, wurden die drei Zellklone „A1“, „A3“ und „B1“ jeweils mit Paclitaxel und Lalistat inkubiert.

Dafür wurden die Zellen wie in 3.1.4 beschrieben in 96-Well-Platten ausgesät. Am Folgetag wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig am Boden der

Platte angewachsen sind. In einem 15 ml Falcon wurde Medium mit Lalistat und DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 25, 50 μ M) angesetzt und mit einer Pipette je 100 μ l/Well auf die Zellen gegeben.

Nach 3 Tagen wurden eine Verdünnungsreihe mit 40 μ M Paclitaxel angesetzt. Beginnend in Spalte 2 einer 96-Well-Platte wurde Paclitaxel im Verhältnis 1:2 auf einen neuen Lalistat/DMSO-Ansatz titriert. Spalte 1 und 12 dienten als Mock-Behandlung, Schema des Versuchsaufbaus s. Abbildung 3.1. Je 100 μ l der Verdünnungsreihe wurden auf die präinkubierten Zellen gegeben. Nach weiteren 3 Tagen Inkubation unter täglicher mikroskopischer Kontrolle wurde dann die mittlere inhibitorische Konzentration mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen, s. 3.2.2.

3.3.5 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Um die Zellklone „A1“, „A3“ und „B1“ näher zu charakterisieren, wurde eine Quantifizierung ausgewählter Gene mittels quantitativer Real Time PCR (qPCR)-Analyse durchgeführt. Dafür wurde zunächst die messenger RNA (mRNA) aus den Zellklonen isoliert. Nach Messung der mRNA-Konzentration im Spektralphotometer folgte die Synthese der komplementären DNA (cDNA), die als Ausgangspunkt für die qPCR-Analyse genutzt wurde.

Isolation der mRNA

Die mRNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des „ReliaPrep® RNA Miniprep Systems“ von Promega in Anlehnung an das Herstellerprotokoll [125]. Zur Vorbereitung der mRNA-Isolation wurden die Zellklone in 6-Well-Platten in einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ /ml ausgesät. Um das Kontaminationsrisiko zu verringern wurde auf eine sterile Arbeitsweise geachtet. Alle Reaktionsgefäße wurden vor Versuchsbeginn beschriftet. Zur Lysierung der Zellen wurde 250 μ l Lysepuffers mit 1-Thioglycerol (BL + TG Puffer) in jedes Well der 6-Well-Platte gegeben [125]. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der 6-Well-Platte gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Über 7-maliges Auf- und Abnehmen der Suspension mit einer Kanüle wurden die Zellen vollständig lysiert. Nach Zugabe von 85 μ l Isopropanol wurde die Zellsuspension für 5 s gevortexed, in eine ReliaPrep®-Minicolumn überführt und für 30 s bei 14 000 x g zentrifugiert [125]. Nach Verwurf des Durchflusses und Zugabe von 500 μ l RNA Wash Solution wurde die Suspension erneut für 30 s bei 14 000 x g zentrifugiert. Pro Probe wurden 30 μ l des frisch angesetzten DNase I Mix, bestehend aus 24 μ l Yellow Core Buffer, 3 μ l 0,09M MnCl₂ und 3 μ l DNase I Enzym, direkt auf die Membran der Minicolumn aufgetragen. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 μ l Column Wash Solution hinzugefügt, für 15 s bei 14 000 x g zentrifugiert, dann erneut 500 μ l RNA Wash Solution zugegeben und für 30 s bei 14 000 x g zentrifugiert. Die ReliaPrep®-Minicolumn wurde in eine neue Collection-Tube gestellt, 300 μ l RNA Wash Solution hinzugefügt und für 2 min bei „high speed“ zentrifugiert. In einer neuen Elution-Tube wurden 30 μ l Nuklease-freies Wasser direkt auf die Membran der Minicolumn aufgetragen und für 1 min bei 14 000 x g zentrifugiert.

Es folgte die sofortige Lagerung auf 4 °C und die Langzeitlagerung der mRNA bei -80 °C [125].

Messung der mRNA-Konzentration

Die mRNA-Konzentration wurde mit einem Spektralphotometer (ThermoScientific® NanoDrop®) gemessen. Zunächst wurde die Messfläche des NanoDrop® mit Ethanol und einem staubfreien Papiertuch gereinigt. Zur Bestimmung des Leerwertes wurde 1 µl Nuklease-freies H₂O verwendet. Je 1 µl jeder mRNA Probe wurde zur Messung auf die optische Messoberfläche aufgetragen. Der Absorptionskoeffizient 260/280 zeigt den Reinheitsgrad der Probe an. Bei Werten um einen Absorptionskoeffizienten von 2 gilt die Probe als rein. Bei deutlich abweichenden Werten muss von Verunreinigungen ausgegangen werden. Nach der Messung wurden die Proben wieder bei -80 °C eingelagert oder die cDNA-Synthese direkt im Anschluss durchgeführt.

cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte im Anschluss an die mRNA-Isolation mit dem „SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ von Invitrogen [126]. Alle benötigten Kit-Komponenten wurden aufgetaut und während der gesamten Versuchsdauer bei 4 °C auf Eis bei 4 °C gelagert. Die Mischung der löslichen Testbestandteile erfolgte durch Invertieren und kurzes Zentrifugieren. Für eine mRNA-Grundlösung mit einer Konzentration von 1 µg und einem Volumen von 10 µl, wurden 7 µl mRNA, 1 µl dNTPs und 2 µl Random Hexamer Primer durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Zur Denaturierung der mRNA Sekundärstrukturen wurden die Proben erst für 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und dann für 1 min auf Eis abgekühlt. Für jede der Proben wurde ein Reaktionsansatz aus 2 µl 10x RT Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNase OUT frisch angesetzt und auf Eis gehalten [126]. Die insgesamt 9 µl wurden dann zu jeder mRNA-Grundlösung hinzugegeben und zur Mischung der Komponenten kurz zentrifugiert. Nach 2-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte die Zugabe von 0,25 µl des Enzyms Superscript II Reverse Transkriptase zu jeder Probe. Der Reaktionsansatz wurde erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde er im Thermocycler für 50 min bei 42 °C, dann für 15 min bei 70 °C inkubiert und abschließend auf Eis bei 4 °C abgekühlt. Die fertige cDNA konnte im Anschluss bei -20 °C gelagert werden [126].

Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Zunächst wurden die cDNA-Proben mit den jeweils 1:10 verdünnten Primern (10 µl Primer-Stocklösung und 90 µl nucleasefreies Wasser) und das SYBR Green zur Herstellung des Master Mixes auf Eis aufgetaut. Der Master Mix bestand aus insgesamt 4 µl mit 2,5 µl SYBR Green, jeweils 0,5 µl des forward und reverse Primers und 0,5 µl nukleasefreiem Wasser. Nachdem die Wells in der 384-Well-Platte nach Pipettierschema markiert wurden, wurden jeweils 4 µl des Master Mixes in jedes Well pipettiert. Im Anschluss wurde dann 1 µl der aufgetauten cDNA zugefügt und für eine ausreichende Mischung kurz auf- und abpipettiert. Zum Verschluss der 384-Well-

Platte wurde eine selbstklebende Sealingfolie verwendet und die Platte kurz zentrifugiert. Zum Start der qPCR wurde die Platte in den LightCycler gestellt und das Programm gestartet.

3.4 Tamoxifen

3.4.1 Adjuvante Effekte der sauren Lipase Inhibition auf MCF-7 Zellen und Tamoxifen-resistente MCF-7 Zellen

Die Zellen wurden wie in 3.1.4 beschrieben in 96-/384-Well-Platten ausgesät.

Am Folgetag wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig am Boden der Platte angewachsen sind. In einem 15 ml Falcon wurde Medium mit Lalistat und DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 25 μ M) angesetzt und mit einer Pipette je 100 μ l/Well auf die Zellen gegeben.

Nach 3 Tagen wurden eine Verdünnungsreihe mit 100 μ M Tamoxifen angesetzt. Beginnend in Spalte 2 einer 96-Well-Platte wurde Tamoxifen im Verhältnis 1:2 auf einen neuen Lalistat/DMSO-Ansatz titriert. Spalte 1 und 12 dienten als Mock-Behandlung, Schema des Versuchsaufbaus s. Abbildung 3.1. Je 100 μ l der Verdünnungsreihe wurden auf die präinkubierten Zellen gegeben. Nach weiteren 3 Tagen Inkubation unter täglicher mikroskopischer Kontrolle wurde dann die mittlere inhibitorische Konzentration mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen, s. 3.2.2.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller dargestellten Versuche wurde mit den Programmen GraphPad Prism 9 und Microsoft Excel durchgeführt. Eine Normalverteilung der zugrundeliegenden Grundgesamtheit erschien so plausibel, dass für die statistische Analyse der ungepaarte t-Test verwendet wurde. Ergänzend wird darauf verwiesen, dass der t-Test gegenüber einer Verletzung der Normalverteilungsannahme robust ist [127]. Das Signifikanzniveau, gekennzeichnet als *, gilt wie folgt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

In den abgebildeten Tabellen werden alle Ergebnisse als das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Anti-Tumorwirkung von Anthracyclin in MDA-MB-231-Zellen

Die leitliniengerechte Systemtherapie des triple-negativen Brustkrebses besteht aus der Kombination aus einem Anthracyclin und einem Taxan, s. Kapitel 1.1.3.3. Für die Paclitaxel-induzierte Apoptose und Antiproliferation konnte in *in-vitro* Versuchen bereits ein adjuvanter Effekt der Inhibition der sauren Lipase nachgewiesen werden [116]. Der adjuvante Effekt von Lalistat auf die Anthracyclin-induzierte Apoptose und Antiproliferation wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays und des CellTox® Green Cytotoxicity Assays nachgewiesen. Dabei wurde die MDA-MB-231 Zelllinie als TNBC-Zellmodell gewählt.

4.1.1 Anthracyclin-induzierte Apoptose

Zur Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Anthracyclin-induzierte Apoptose wurden die MDA-MB-231 Zellen 24 h nach ihrer Aussaat für drei Tage mit jeweils 5, 10, 25 und 50 μM Lalistat präinkubiert. Anschließend folgte eine sechstägige Koinkubation mit Lalistat und Doxorubicin in Konzentrationen zwischen 0,05 und 400 μM . Abschließend wurde die Zellviabilität mit dem CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Als Messgröße diente hierbei die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}). Der IC_{50} -Wert beschreibt die Konzentration eines Inhibitors, bei der die Hälfte der möglichen Hemmung erreicht wird.

In der Abbildung 4.1 ist für die o.g. Lalistat-Konzentrationen jeweils eine Dosis-Wirkungskurve in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

In der Tabelle 4.1 sind die IC_{50} -Werte für 5-50 μM Lalistat einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung und Signifikanzwert dargestellt.

MDA-MB-231

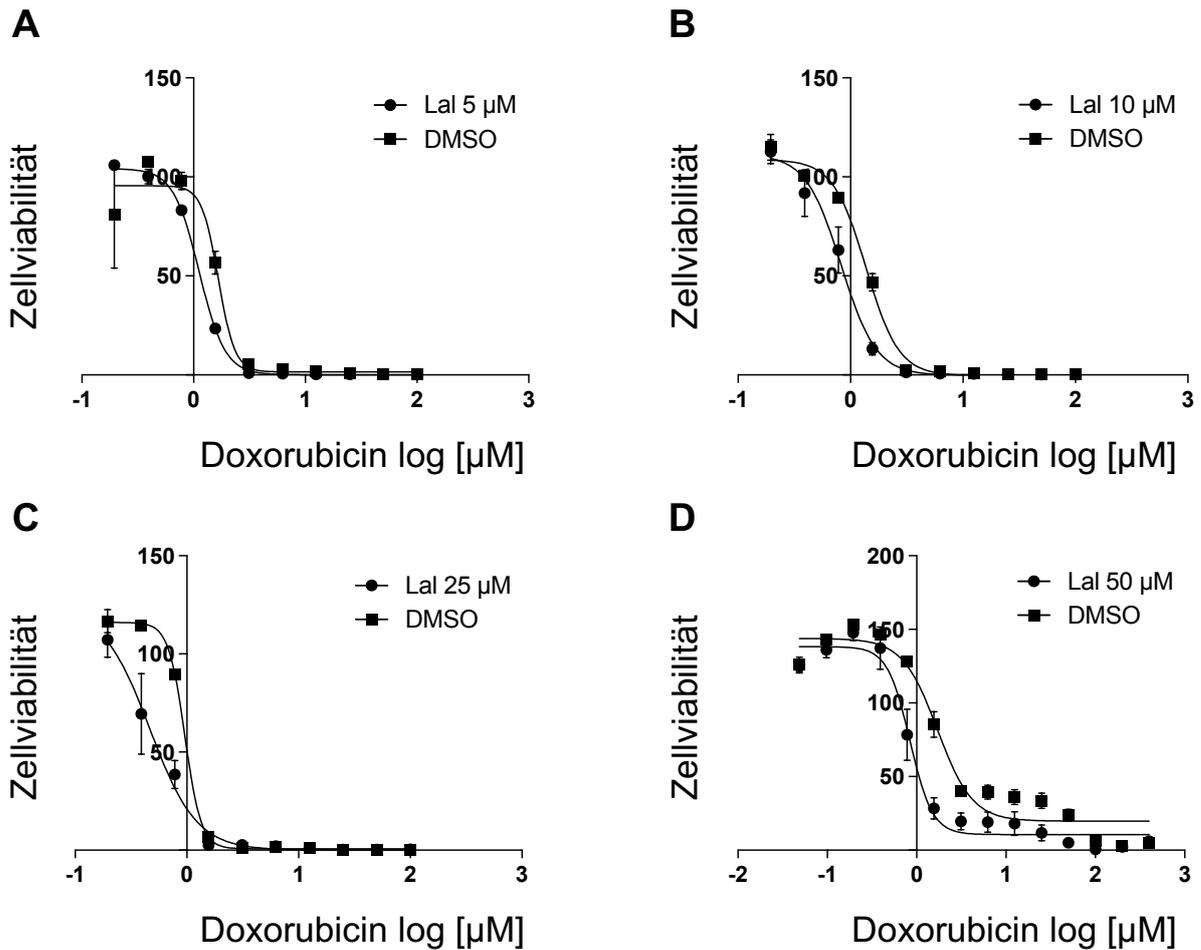


Abbildung 4.1: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von MDA-MB-231 Zellen mit Anthracyclin

MDA-MB-231 Zellen wurden 24 h nach Aussaat für drei Tage mit 5 µM (A), 10 µM (B), 25 µM (C) und 50 µM (D) Lalistat präinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für sechs Tage mit einer Doxorubicin-Konzentration von 0,195-100 µM (A-C) und 0,05-400 µM (D) inkubiert. Mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wurde dann die Zellviabilität bestimmt, eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und die IC₅₀ berechnet. Zur besseren graphischen Übersicht sind die Doxorubicin-Konzentrationen logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen. Die Werte wurden auf die Mock-Werte normalisiert, n = 4 (A-C), n = 9 (D). Negativkontrollen mit DMSO wurden äquivalent zu jedem Versuch durchgeführt (vergleiche Steigerwald et al., 2023 Abb. S3) [116].

Tabelle 4.1: Übersicht der IC₅₀-Werte von Lalistat und DMSO in MDA-MB-231 Zellen

Die abgebildete Tabelle zeigt die IC₅₀-Werte in mikromolar von 5, 10, 25 und 50 µM Lalistat und DMSO. Die IC₅₀-Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung berechnet aus der IC₅₀ der Einzelversuche. Die statistische Signifikanz zwischen Lalistat und DMSO ist als P-Wert angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: p > 0,05: nicht signifikant (n.s.), p < 0,05: signifikant (vergleiche Steigerwald et al., 2023, Abb. S3) [116].

	IC₅₀ [µM] ± SD	IC₅₀ Reduktion [%]	P-Wert Δ
Lalistat 5 µM	1,12 ± 0,03	21,1	0,2378
DMSO 5 µM	1,42 ± 0,45		
Lalistat 10 µM	0,82 ± 0,32	42,3	0,0267
DMSO 10 µM	1,42 ± 0,25		
Lalistat 25 µM	0,41 ± 0,37	59,8	0,0251
DMSO 25 µM	1,02 ± 0,18		
Lalistat 50 µM	0,84 ± 0,26	54,8	0,0081
DMSO 50 µM	1,86 ± 0,97		

Bei Hinzugabe von Lalistat zu Doxorubicin kann je nach Lalistat-Konzentration die IC₅₀ von 21 % (Lalistat 5 µM) bis 59,8 % (Lalistat 25 µM) gesenkt werden.

Für 10-50 µM Lalistat war der Unterschied zur Kontrolle statistisch signifikant.

Für den Vergleich der verschiedenen Konzentrationen von Lalistat untereinander und DMSO untereinander ließ sich für die IC₅₀-Werte gemäß Anova Analyse kein statistischer Unterschied nachweisen.

4.1.2 Anthracyclin-induzierte Antiproliferation

Um den adjuvanten Effekt der Inhibition der sauren Lipase auf die Anthracyclin-induzierte Antiproliferation zu messen, wurde zunächst der Konzentrationsbereich bestimmt, in dem Doxorubicin keine zytotoxischen Effekte mehr auf die MDA-MB-231 Zellen zeigt.

24 h nach Aussaat wurden die Zellen für drei Tage mit 25 und 50 µM Lalistat und einer Doxorubicin-Konzentration von 0,195-100 µM koinkubiert. Mit dem CellTox® Green Cytotoxicity Assay wurde dann zunächst der nicht-toxische Bereich von Doxorubicin bestimmt. Nach Ausschluss zytotoxischer Effekte wurde anschließend in dem ermittelten Bereich mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay die Zellviabilität gemessen.

Sowohl bei einer Lalistat-Konzentration von 25 als auch von 50 μM konnte im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 780 nM kein signifikant toxischer Effekt von Doxorubicin auf die MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen werden.

Zytotoxizität

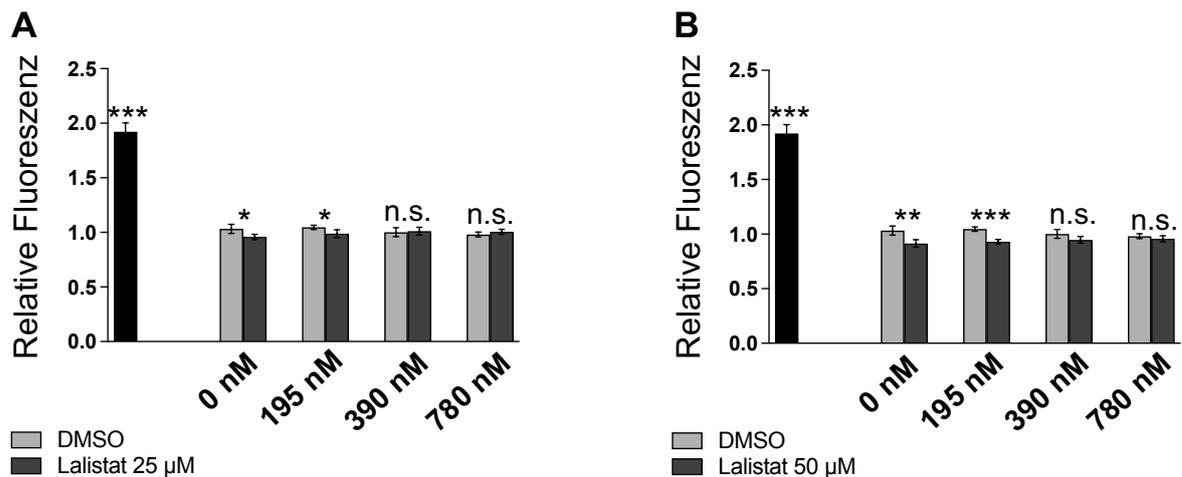


Abbildung 4.2: Evaluation des nicht-toxischen Bereichs von Doxorubicin

MDA-MB-231 Zellen wurden 24 h nach Aussaat für drei Tage mit Doxorubicin-Konzentrationen von 0,195-100 μM plus 25 μM Lalistat (A) und 50 μM Lalistat (B) inkubiert. Negativkontrollen mit DMSO wurden durchgeführt. Mit dem CellTox® Green Cytotoxicity Assay wurde der nicht-toxische Bereich des Doxorubicins festgelegt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: nicht signifikant (n.s.) = $p > 0,05$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (vergleiche Steigerwald et al., 2023, Abb. S3) [116].

Im zuvor bestimmten nicht-toxischen Doxorubicin-Konzentrationsbereich von 0-780 nM wurden die adjuvanten Effekte von Lalistat auf die Anthracyclin-induzierte Antiproliferation untersucht (s. Abbildung 4.3). Sowohl für 50 als auch für 25 μM Lalistat lässt sich eine signifikante Reduktion der Doxorubicin-induzierten Zellproliferation beobachten. Das lässt sich auf einen synergistischen Effekt von Lalistat und Doxorubicin auf die Antiproliferation zurückführen. Dieser Effekt steigt proportional zur Doxorubicin-Konzentration an und ist bei der maximalen Doxorubicin-Konzentration von 780 nM bei 50 μM Lalistat am stärksten ausgeprägt.

Antiproliferative Effekte

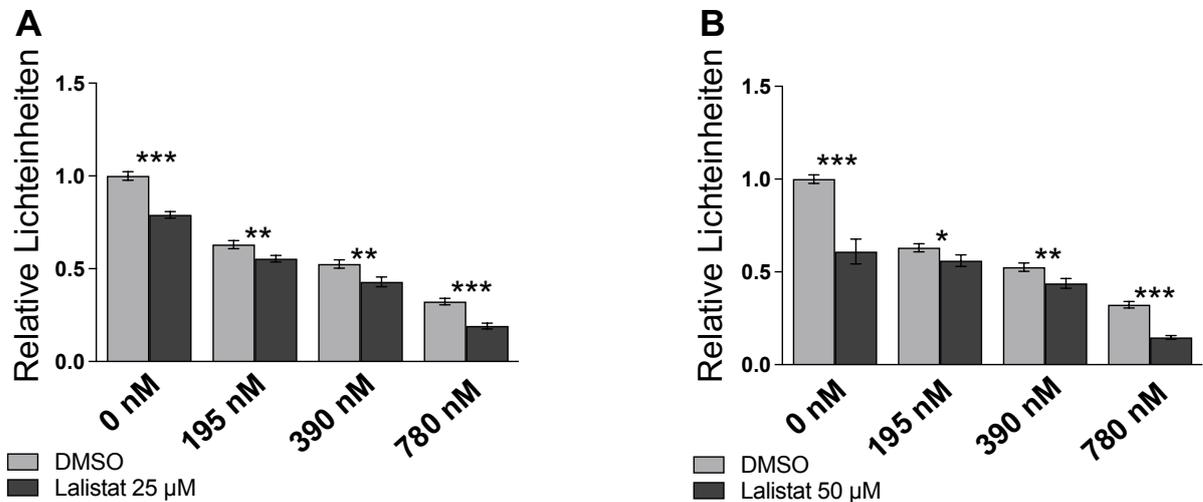


Abbildung 4.3: Synergistischer Effekt von Lalistat und Doxorubicin auf die Antiproliferation von MDA-MB-231 Zellen

MDA-MB-231 Zellen wurden 24 h nach Aussaat für drei Tage mit Doxorubicin-Konzentrationen von 0,195-0,780 µM plus 25 µM Lalistat (A) und 50 µM Lalistat (B) inkubiert. Negativkontrollen mit DMSO wurden durchgeführt. Mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wurde dann die Zellviabilität bestimmt und die IC_{50} berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (vergleiche Steigerwald et al., 2023, Abb. S3) [116].

4.2 Untersuchung des adjuvanten Effektes der Inhibition der sauren Lipase auf die Anti-Tumorwirkung von Paclitaxel in langzeitbehandelten MDA-MB-231-Zellen

Neben Doxorubicin spielen Taxane wie Paclitaxel in der Kombinationstherapie des TNBC eine wesentliche Rolle. Dabei ist Paclitaxel oft für mehrere Wochen bis Monate Teil des Therapieregimes. Ein möglicher adjuvanter Effekt von Lalistat auf Paclitaxel in langzeitbehandelten TNBC-Zellen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Um die Gegebenheiten einer Paclitaxel-Langzeitbehandlung in ein *in-vitro* Modell zu übertragen und die adjuvante Therapie mit Lalistat unter diesen Bedingungen untersuchen zu können, wurde eine Paclitaxel-langzeitbehandelte MDA-MB-231 Zelllinie entwickelt.

4.2.1 Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zelllinie

Um die klinische Situation einer mehrmonatigen Paclitaxel-Behandlung *in-vitro* nachzustellen, wurden die MDA-MB-231 Zellen über einen Zeitraum von sieben Monaten intermittierend mit steigenden Dosen Paclitaxel behandelt. Zu Beginn wurden die Zellen mit einer Startkonzentration von 1,5 nM Paclitaxel behandelt. Nach jeweils drei Tagen wurde das Paclitaxel von den Zellen entfernt und diese zur Erholung für jeweils vier Tage in Paclitaxel-freiem Zellmedium inkubiert. Die Konzentration wurde nach jeweils 2-3 Wochen um das 1,5-fache erhöht.

Nach der finalen Dosis von 35 nM Paclitaxel wurde eine morphologische Veränderung der MDA-MB-231 Zellen mit deutlich kubischerer Zellform sichtbar (s. Abbildung 4.4). Um eine homogenere Population der morphologisch veränderten Zellen zu erhalten, wurden aus dieser Population mehrere Zellklone isoliert. Dafür wurden 80 Zellen auf 10 ml in einer 96-Well-Platte ausgesät und das Zellwachstum täglich im Mikroskop kontrolliert. Die Wells, in denen aus einem Zellklon eine neue Zellpopulation heranwuchs, wurden anschließend in Zellkulturflaschen umgesiedelt. So entstanden insgesamt die drei Zellklone A3, B1 und A1 mit optisch deutlich ähnlicherer Zellpopulation.

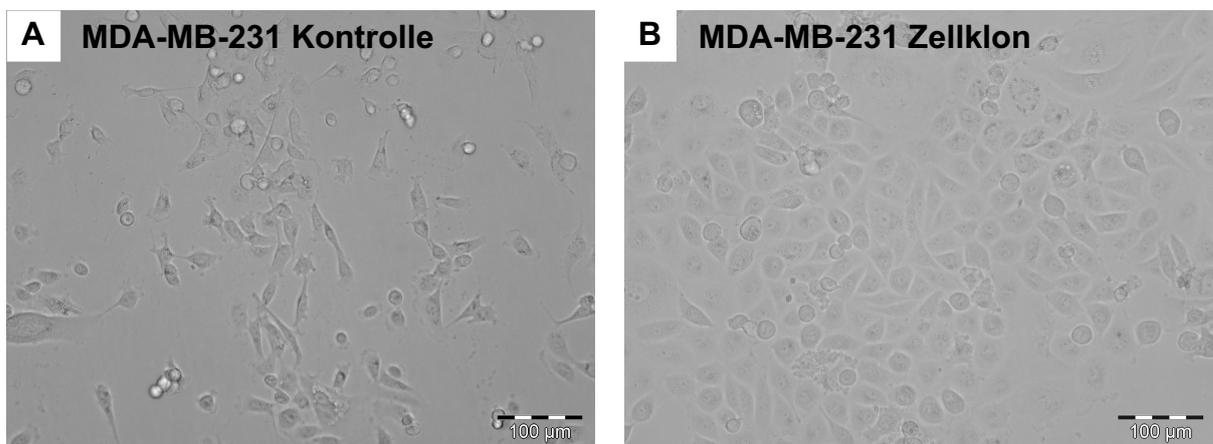


Abbildung 4.4: Morphologieänderung von MDA-MB-231 Zellen im Verlauf der mehrmonatigen Paclitaxel-Behandlung

MDA-MB-231 Zellen ohne Paclitaxel-Behandlung (A) mit typisch mesenchymlalem Muster. Nach 7 Monaten wöchentlich steigender Paclitaxel-Dosis Veränderung in Richtung eines epithelialeren Phänotyps mit Entwicklung einer homogenen Langzeit-Paclitaxel behandelten Population (B) durch Isolation eines einzelnen Zellklons.

4.2.2 Wachstumsverhalten der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone

Um das *in-vitro* Verhalten der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen genauer zu charakterisieren, wurde das Wachstumsverhalten der Zellklone untersucht.

Dafür wurden die MDA-MB-231 Zellklone gemeinsam in einer 96-Well-Platte ausgesät. Mittels des CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay wurde dann zu den Messzeitpunkten 0, 24 und 48 h über Ermittlung des zellulären ATP-Gehaltes die Zellproliferation bestimmt. Als Kontrolle (F) wurden unbehandelte MDA-MB-231 Zellen verwendet.

Die Zellklone A3, B1 und A1 zeigten nach 48 h keinen signifikanten Unterschied im ATP-Gehalt. Im Gegensatz dazu zeigten die MDA-MB-231-Zellen der unbehandelten Kontrolle ein fast doppelt so hohes ATP-Level (s. Abbildung 4.5).

Damit konnte gezeigt werden, dass die unbehandelte MDA-MB-231 Kontrolle signifikant schneller wächst als die drei Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellklone.

Proliferation

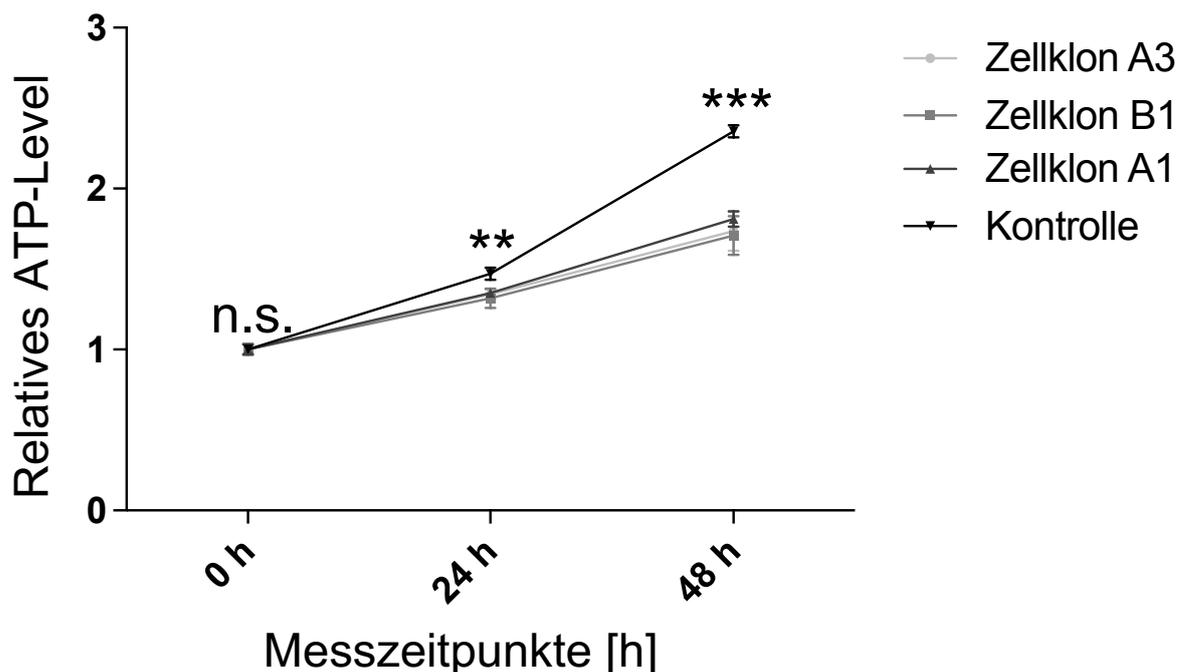


Abbildung 4.5: Proliferationsmessung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone zu verschiedenen Zeitpunkten

Zu den Zeitpunkten 0, 24 und 48 h wurde das relative ATP-Level der Zellklone A3, B1, A1 und einer unbehandelten Kontrolle mittels des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay gemessen. Über die Höhe des ATP-Levels konnten Rückschlüsse über die entsprechende Anzahl der Zellen gestellt werden. Um das Wachstum der Zellen im Verlauf beurteilen zu können, wurde die Grafik erstellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: nicht signifikant (n.s.) = $p > 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Für die nachfolgenden Versuche wurden aus den Zellklonen A1, A3 und B1 repräsentativ die zwei Zellklone A3 und B1 ausgesucht, da sie sich am besten über einen längeren Zeitraum kultivieren ließen.

4.2.3 Molekulare Charakterisierung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone

Zusätzlich zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Zellklone wurden diese im Rahmen von quantitativen PCR-Untersuchungen molekulargenetisch hinsichtlich typischer TNBC-Zelleigenschaften, wie beispielsweise einer erhöhten Expression von Stammzellmarkern, untersucht.

Zur Durchführung der qPCR wurde die RNA der Zellklone unter sterilen Bedingungen mittels des „ReliaPrep® Miniprep Systems“ isoliert. Die Messung der mRNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektralphotometer. Im Anschluss wurde die cDNA Synthese mit Hilfe des PCR-Kit „SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ durchgeführt. Die cDNA wurde dann zusammen mit den Primern der im Folgenden genannten Gene in eine 384-Well-Platte pipettiert und das PCR-Programm im Light Cycler gestartet.

Für den nachfolgenden Versuch wurde nur der Zellklon A3 mit der Kontrolle (F) verglichen. Die untersuchten Gene wurden jeweils auf die Referenzgene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

Zur Untersuchung des Stammzellcharakters wurde die Expression der Stammzellmarker CD44/CD24 und ALDH1, s. Kapitel 1.3.3, untersucht. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Zellklon A3 im Vergleich zur Kontrolle (F), den Stammzellmarker ALDH1 um den Faktor 1,89 (normalisiert auf HPRT1) bzw. 1,78 (normalisiert auf GAPDH) signifikant geringer exprimiert (Abb. 4.7). Auch das Verhältnis der Stammzellmarker CD44/CD24 ist in den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen etwa um das 4,6-fache geringer.

CD44/CD24

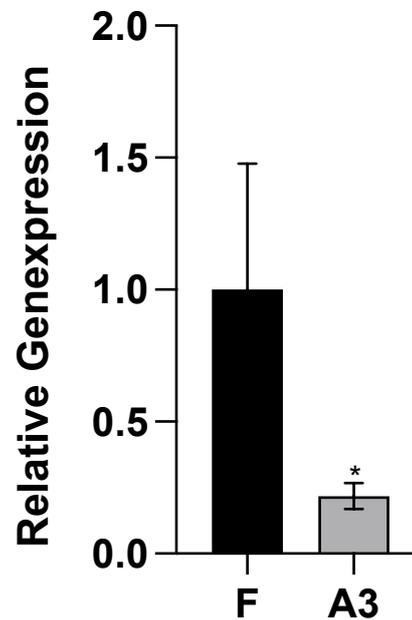


Abbildung 4.6: Exprimierung von CD44/CD24 in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen

In einer qPCR Untersuchung wurde die Langzeit-Paclitaxel behandelte MDA-MB-231 Zelllinie, dargestellt als Zellklon A3, auf die Expression des Stammzellmarkers CD44/CD24 untersucht. Verglichen wurden die Zellen mit nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen, dargestellt als Kontrolle F, und normalisiert auf eins. $n = 3$. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: * = $p < 0,05$.

ALDH1

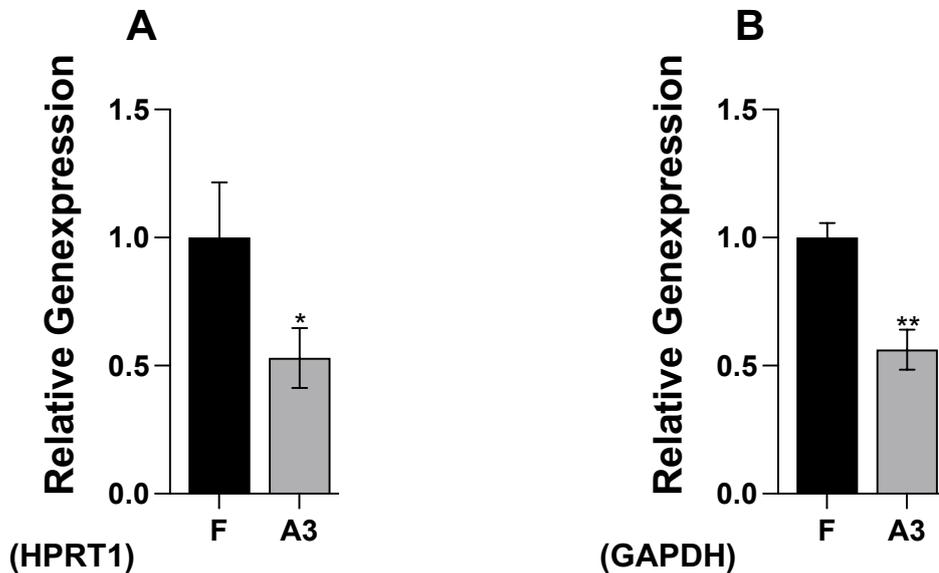


Abbildung 4.7: Expressierung von ALDH1 in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen

In einer qPCR Untersuchung wurde die Langzeit-Paclitaxel behandelte MDA-MB-231 Zelllinie, dargestellt als Zellklon A3, auf die Expression des Stammzellmarkers ALDH1 untersucht. Verglichen wurden die Zellen mit nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen, dargestellt als Kontrolle F und normalisiert auf eins. Die Ergebnisse sind auf HPRT1 (A), $n = 3$ und GAPDH (B), $n = 2$ normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Auf Grund der morphologischen Veränderung der behandelten Zellklone, s. Abbildung 4.4, wurde die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin sowie die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin untersucht.

E-Cadherin als Adhäsionsmolekül in Epithelzellen vermittelt Zell-Zell-Kontakte im gesunden Gewebe [128]. Im Brustkrebs wird E-Cadherin als Tumorsuppressoren nachweislich herunterreguliert [128]. Auf Grund der Funktionen von E-Cadherin ist der Expressionsverlust von E-Cadherin in Tumoren mit invasivem Wachstum und einer vermehrten Metastasierungstendenz assoziiert [128].

Der Zellklon A3 zeigt eine um den Faktor 1,6 (normalisiert auf HPRT1; statistisch nicht signifikant) und 1,8 (normalisiert auf GAPDH) erhöhte Expression von E-Cadherin im Vergleich zur triple-negativen Kontrolle (F).

E-Cadherin

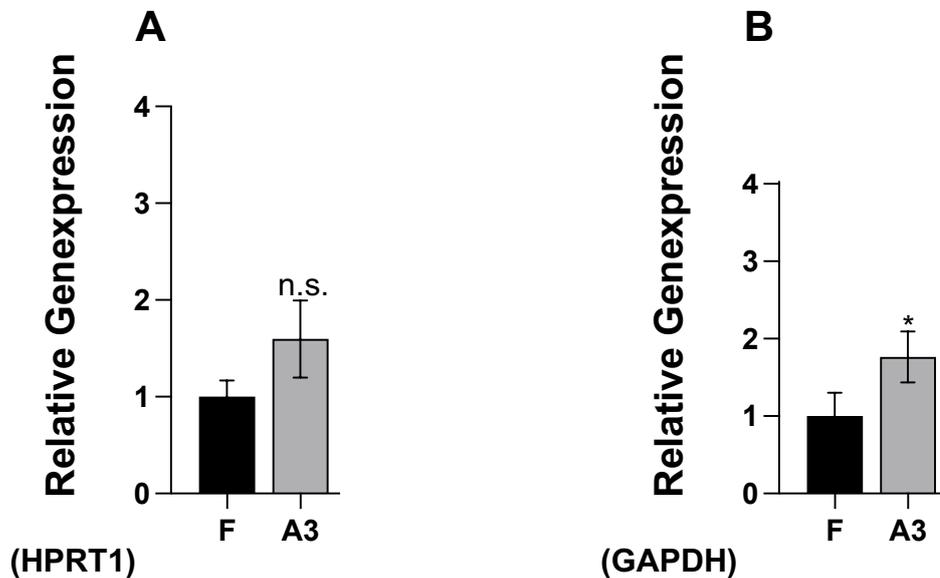


Abbildung 4.8: Expressierung von E-Cadherin in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen

In einer qPCR Untersuchung wurde die Langzeit-Paclitaxel behandelte MDA-MB-231 Zelllinie, dargestellt als Zellklon A3, auf die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin untersucht. Verglichen wurden die Zellen mit nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen, dargestellt als Kontrolle F und normalisiert auf eins. Die Ergebnisse sind auf HPRT1 (A), $n = 3$ und GAPDH (B), $n = 3$ normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: nicht signifikant (n.s.) = $p > 0,05$, * = $p < 0,05$.

Vimentin als Intermediärfilament spielt in Tumoren eine Rolle bei der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) [129]. Im Prozess der EMT gehen die epithelialen Eigenschaften der Zelle zugunsten mesenchymaler Charakteristika verloren, die mit der Tumordinvasion und -metastasierung verbunden sind [129]. In den durchgeführten qPCR-Untersuchungen zeigt der Zellklon A3 eine signifikante Reduktion der Vimentin Expression um den Faktor 1,8 (normalisiert auf HPRT1) und um den Faktor 1,6 (normalisiert auf GAPDH).

Vimentin

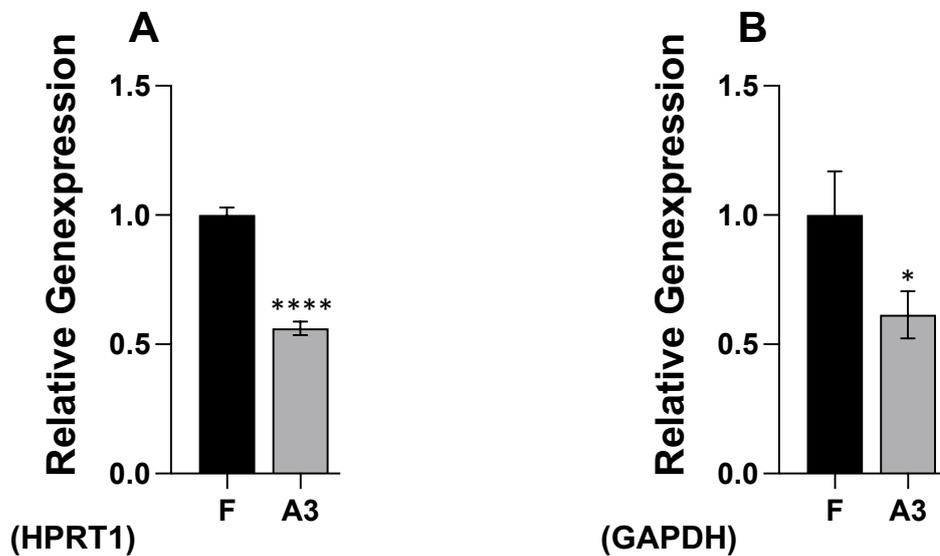


Abbildung 4.9: Expressierung von Vimentin in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen

In einer qPCR Untersuchung wurde die Langzeit-Paclitaxel behandelte MDA-MB-231 Zelllinie, dargestellt als Zellklon A3, auf die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin untersucht. Verglichen wurden die Zellen mit nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen, dargestellt als Kontrolle F und normalisiert auf eins. Die Ergebnisse sind auf HPRT1 (A), $n = 3$ und GAPDH (B), $n = 3$ normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: * = $p < 0,05$, **** = $p < 0,0001$.

Um den Grad der Malignität der Zellklone weiter eingrenzen zu können, wurde die Expression des Protoonkogens c-Myc untersucht. Mit abnehmendem Grad der Differenzierung konnte im Brustkrebs eine deutlich erhöhte c-Myc Expression von bis zu 31 % beobachtet werden [130]. In den untersuchten Zellklonen wird c-Myc im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (F) um den Faktor 1,9 (normalisiert auf HPRT1) und 1,8 (normalisiert auf GAPDH) vermindert exprimiert.

c-Myc

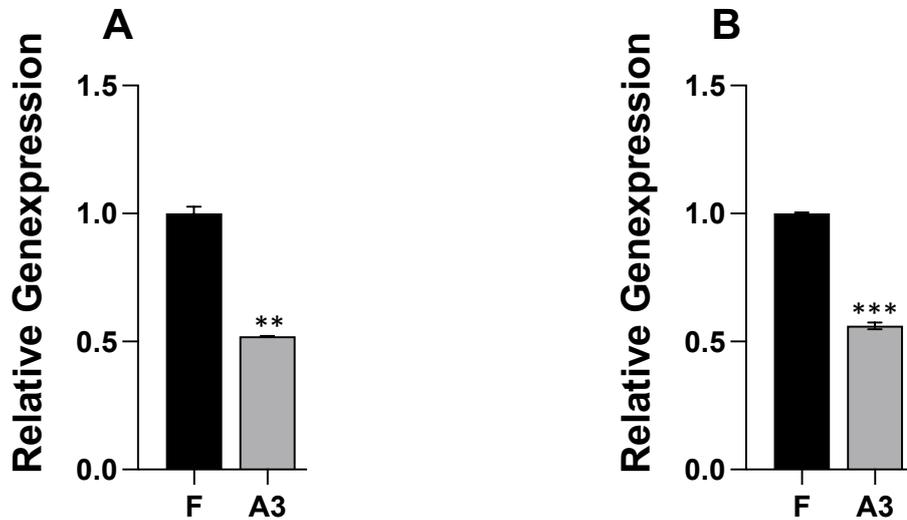


Abbildung 4.10: Expressierung von c-Myc in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen

In einer qPCR Untersuchung wurde die Langzeit-Paclitaxel behandelte MDA-MB-231 Zelllinie, dargestellt als Zellklon A3, auf die Expression des Protoonkogens c-Myc untersucht. Verglichen wurden die Zellen mit nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen, dargestellt als Kontrolle F und normalisiert auf eins. Die Ergebnisse sind auf HPRT1 (A), $n = 2$ und GAPDH (B), $n = 2$ normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Zur Einschätzung einer potentiellen Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, s. Kapitel 1.1.3.3, nach Paclitaxel-Behandlung wurde zusätzlich zu den oben genannten Genen die Expression des Programmed death-ligand 1 (PD-L1) untersucht. PD-L1 zeigt im Zellklon A3 eine um den Faktor 1,2 (normalisiert auf HPRT1; statistisch nicht signifikant) und 1,3 (normalisiert auf GAPDH) vermehrte Expression.

PD-L1

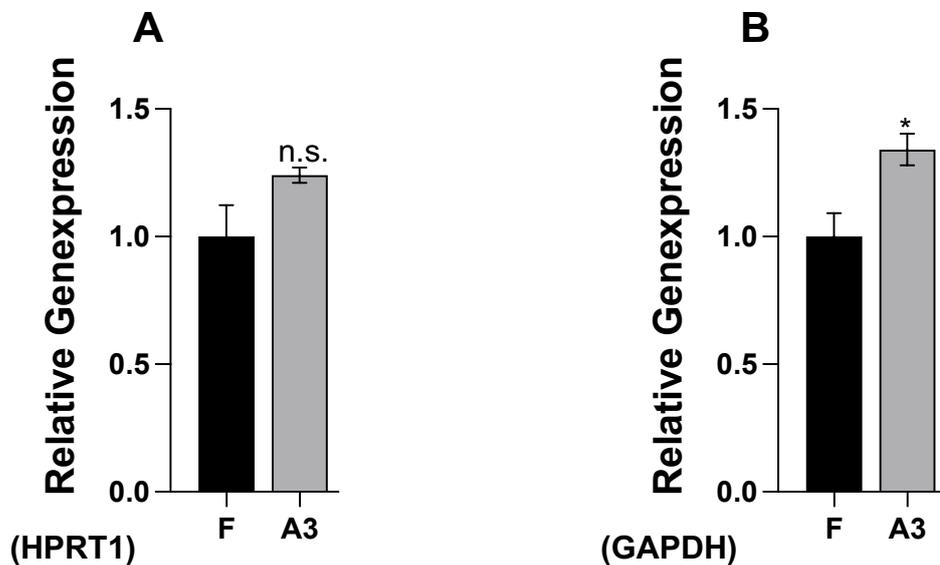


Abbildung 4.11: Expressierung von PD-L1 in Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen

In einer qPCR Untersuchung wurde die Langzeit-Paclitaxel behandelte MDA-MB-231 Zelllinie, dargestellt als Zellklon A3, auf die Expression von PD-L1 untersucht. Verglichen wurden die Zellen mit nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen, dargestellt als Kontrolle F und normalisiert auf eins. Die Ergebnisse sind auf HPRT1 (A), $n = 2$ und GAPDH (B), $n = 2$ normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: nicht signifikant (n.s.) = $p > 0,05$, * = $p < 0,05$.

Zuletzt wurde die Expression des Östrogenrezeptors bestimmt. Dabei konnte in den Zellklonen eine um den Faktor 2 nicht signifikant erhöhte Expression des Östrogenrezeptors im Vergleich zur triple-negativen Kontrolle (F) beobachtet werden.

ER

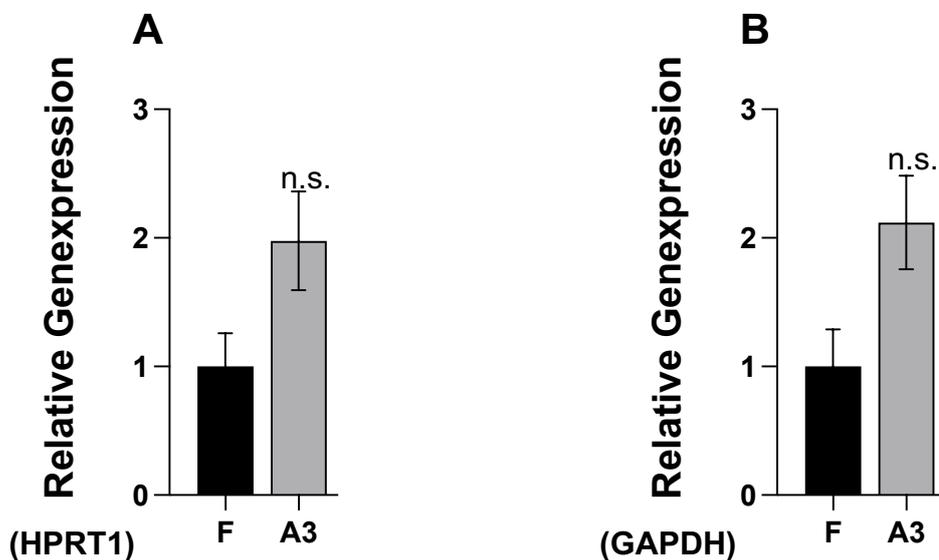


Abbildung 4.12: Expressierung des Östrogenrezeptors in Paclitaxel-Langzeit behandelten MDA-MB-231 Zellen vs. nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen

In einer qPCR Untersuchung wurde die Langzeit-Paclitaxel behandelte MDA-MB-231 Zelllinie, dargestellt als Zellklon A3, auf die Expression des Östrogenrezeptors (ER) untersucht. Verglichen wurden die Zellen mit nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen, dargestellt als Kontrolle F und normalisiert auf eins. Die Ergebnisse sind auf HPRT1 (A), $n = 2$ und GAPDH (B), $n = 2$ normalisiert. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: nicht signifikant (n.s.) = $p > 0,05$.

4.2.4 Untersuchung eines adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase mit Paclitaxel in einem Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellmodell

Zur Untersuchung eines adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Paclitaxel-Behandlung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen wurden die Zellen 24 h nach ihrer Aussaat für drei Tage mit jeweils 10, 25 und 50 μM Lalistat präinkubiert. Anschließend folgte eine sechstägige Koinkubation mit Lalistat und Paclitaxel in Konzentrationen zwischen 0,16-40 μM . Die Zellviabilität wurde dann mit dem CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Als Messgröße diente hierbei der IC_{50} -Wert.

Final wurde dann der adjuvante Effekt von Lalistat auf Paclitaxel im Paclitaxel-langzeitbehandelten Zellmodell dem Effekt in nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen gegenübergestellt. Dafür wurden die IC_{50} -Werte beider Zellmodelle miteinander verglichen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die adjuvante Therapie von unterschiedlichen Konzentrationen Lalistat in mikromolar in Kombination mit einer Paclitaxel-Behandlung zu einer signifikanten Erniedrigung der Zellviabilität im Paclitaxel-langzeitbehandelten Zellmodell führt.

Im Vergleich zu den nicht vorbehandelten TNBC-Zellen ist nach einer Paclitaxel-Langzeitbehandlung eine ähnliche Sensitivität auf die adjuvante Lalistat-Behandlung zu beobachten.

Für die Zellklone A3 und B1 sind in den Abbildungen 4.13 und 4.14 die o.g. Lalistat-Konzentrationen inklusive DMSO-Kontrolle die Dosis-Wirkungskurven in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

In den Tabellen 4.2 und 4.3 sind die entsprechenden IC_{50} -Werte einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung und der Signifikanzwert dargestellt.

Für die Konzentrationen 10, 25 und 50 μM Lalistat in Kombination mit Paclitaxel-Konzentrationen von 0,16-40 μM konnte eine signifikante Erniedrigung der Zellviabilität in Paclitaxel-langzeitbehandelten Zellen gezeigt werden.

Zellklon A3

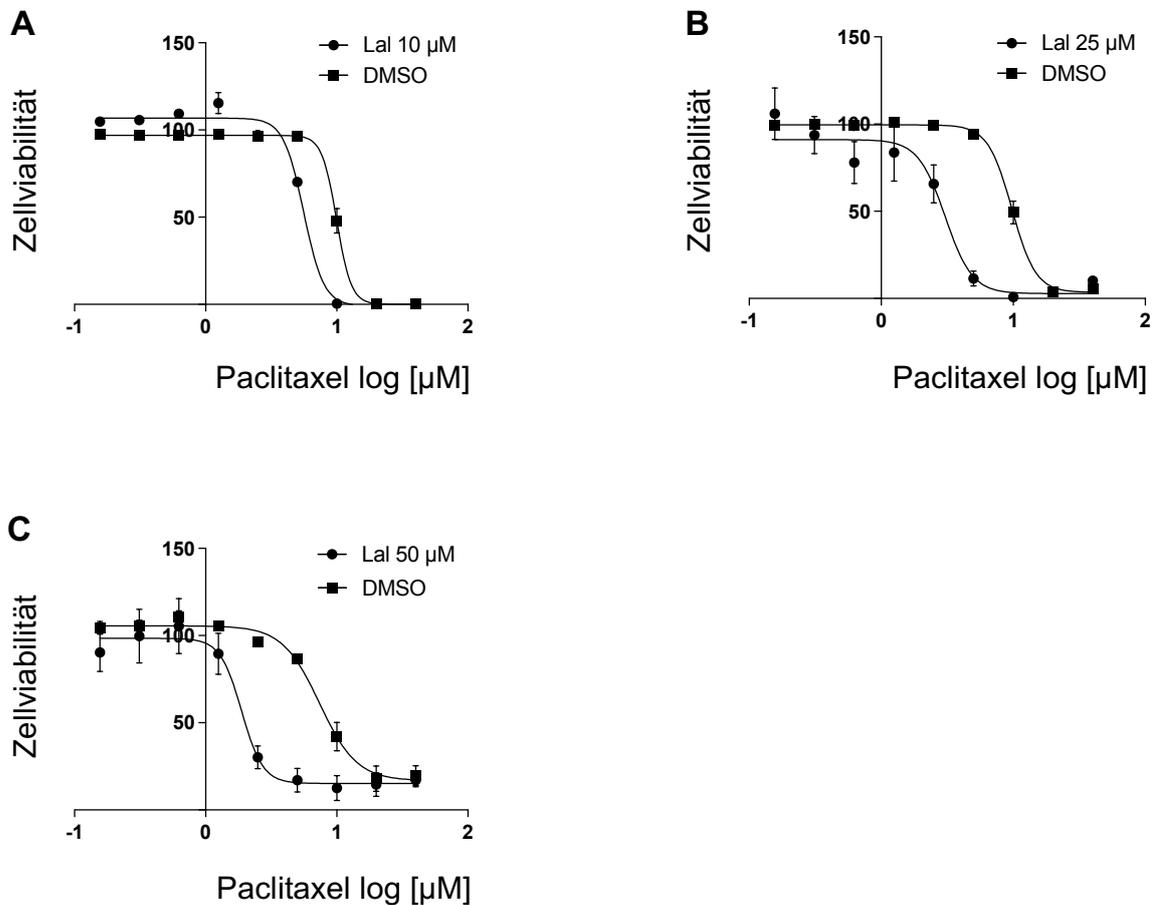


Abbildung 4.13: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von Paclitaxel-langzeitbehandelten MDA-MB-231 Zellen mit Paclitaxel

MDA-MB-231 Zellen wurden 24 h nach Aussaat für drei Tage mit 10 µM (A), 25 µM (B) und 50 µM Lalistat (C) präinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für drei Tage mit einer Paclitaxel-Konzentration von 0,16-40 µM inkubiert. Mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wurde dann die Zellviabilität bestimmt, eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und die IC₅₀ berechnet. Zur besseren graphischen Übersicht sind die Paclitaxel-Konzentrationen logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen. Die Werte wurden auf die geringste Paclitaxel-Konzentration normalisiert, um Plattenrandeffekten entgegenzuwirken, n = 8 (A, B), n = 9 (C). Negativkontrollen mit DMSO wurden äquivalent zu jedem Versuch durchgeführt.

Im Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellklon A3 kann bei adjuvanter Gabe von Lalistat zu Paclitaxel je nach Lalistat-Konzentration die IC₅₀ von 30,5 % (Lalistat 10 µM) bis 76,3 % (Lalistat 50 µM) gesenkt werden.

Für 25-50 µM Lalistat war der Unterschied zur Kontrolle statistisch signifikant.

Für den Vergleich der verschiedenen Konzentrationen von Lalistat untereinander und DMSO untereinander ließ sich für die IC₅₀-Werte gemäß Anova Analyse kein statistischer Unterschied nachweisen.

Tabelle 4.2: Übersicht der IC₅₀-Werte von Lalistat im Vergleich zur DMSO-Kontrolle

Die abgebildete Tabelle stellt die IC₅₀-Werte in mikromolar von 10, 25 und 50 µM Lalistat und DMSO, als Zusammenfassung aus zwei (Lalistat 10 µM) und drei (Lalistat 25 und 50 µM) unterschiedlichen Versuchen, einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$), dar. Der Mittelwert ist berechnet aus der IC₅₀ der zwei / drei Einzelversuche. Die statistische Signifikanz zwischen Lalistat und DMSO ist als P-Wert angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: $p > 0,05$: nicht signifikant (n.s.), $p < 0,05$: signifikant.

	IC₅₀ [µM] ± SD	IC₅₀ Reduktion [%]	P-Wert Δ
Lalistat 10 µM	12,77 ± 13,52	30,5 %	0,3343
DMSO 10 µM	18,38 ± 16,2		
Lalistat 25 µM	2,82 ± 1,36	70,6 %	< 0,0001
DMSO 25 µM	9,58 ± 1,67		
Lalistat 50 µM	1,78 ± 0,51	76,3 %	< 0,0001
DMSO 50 µM	7,5 ± 1,83		

Der Zellklon B1 zeigt insgesamt eine vergleichbare Reduktion der IC₅₀-Werte bei Hinzugabe von Lalistat zu Paclitaxel wie der o.g. Zellklon A3 mit einer signifikanten Minderung der IC₅₀ von 41,4 % (Lalistat 10 µM) bis 87,7 % (Lalistat 50 µM).

Für den Vergleich der verschiedenen Konzentrationen von Lalistat und DMSO untereinander ließ sich für die IC₅₀-Werte gemäß Anova Analyse kein statistischer Unterschied nachweisen.

Zellklon B1

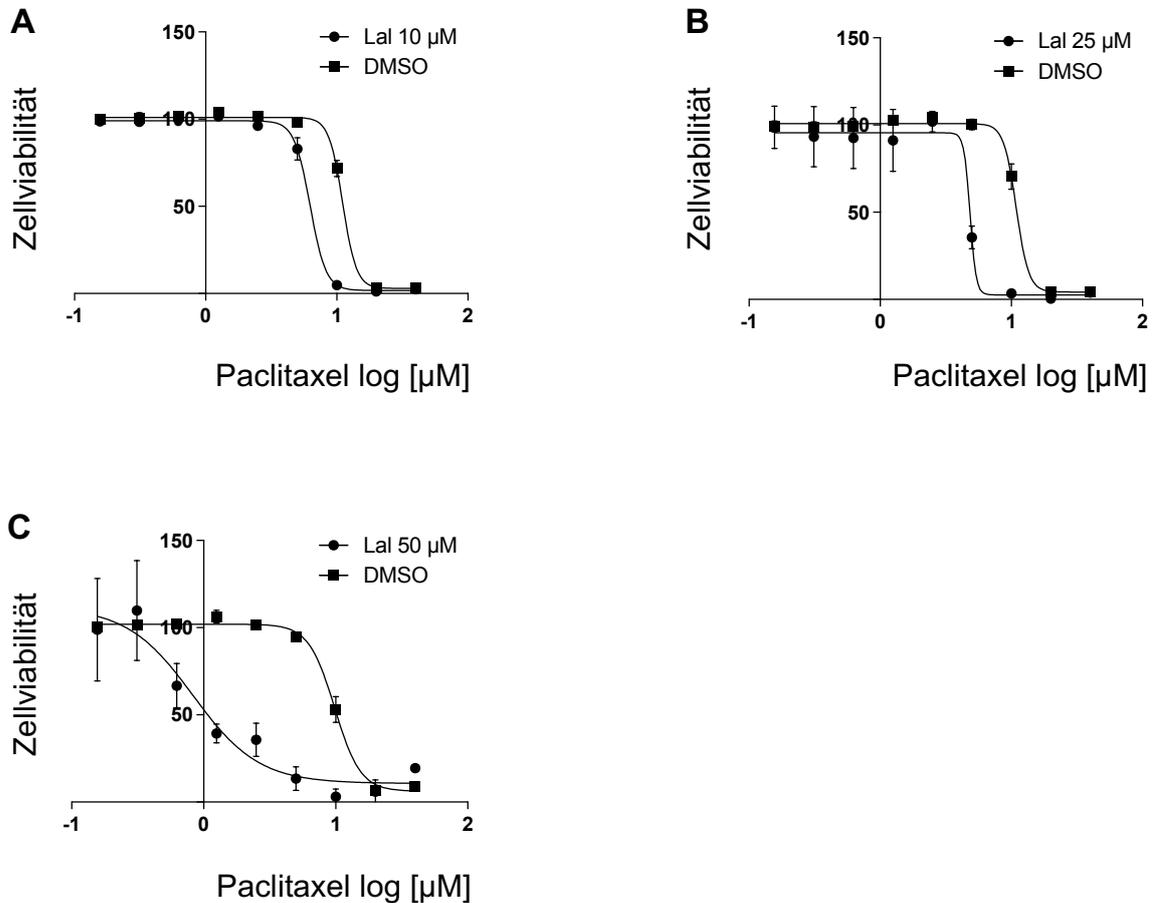


Abbildung 4.14: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von Paclitaxel-langzeitbehandelten MDA-MB-231 Zellen mit Paclitaxel

MDA-MB-231 Zellen wurden 24 h nach Aussaat für drei Tage mit 10 µM (A), 25 µM (B) und 50 µM Lalistat (C) präinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für drei Tage mit einer Paclitaxel-Konzentration von 0,16-40 µM inkubiert. Mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wurde dann die Zellviabilität bestimmt, eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und die IC_{50} berechnet. Zur besseren graphischen Übersicht sind die Paclitaxel-Konzentrationen logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen. Die Werte wurden auf die geringste Paclitaxel-Konzentration normalisiert, um Plattenrandeffekten entgegenzuwirken, n = 8 (B), n = 9 (A, C). Negativkontrollen mit DMSO wurden äquivalent zu jedem Versuch durchgeführt.

Tabelle 4.3: Übersicht der IC₅₀-Werte von Lalistat im Vergleich zur DMSO-Kontrolle

Die abgebildete Tabelle stellt die IC₅₀-Werte in mikromolar von 10, 25 und 50 µM Lalistat und DMSO, als Zusammenfassung aus zwei (Lalistat 25 µM) und drei (Lalistat 10 und 50 µM) unterschiedlichen Versuchen, einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$), dar. Der Mittelwert ist berechnet aus der IC₅₀ der zwei / drei Einzelversuche. Die statistische Signifikanz zwischen Lalistat und DMSO ist als P-Wert angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: $p > 0,05$: nicht signifikant (n.s.), $p < 0,05$: signifikant.

	IC₅₀ [µM] ± SD	IC₅₀ Reduktion [%]	P-Wert Δ
Lalistat 10 µM	6,4 ± 1,16	41,4 %	< 0,0001
DMSO 10 µM	10,93 ± 0,81		
Lalistat 25 µM	5,54 ± 5,78	55,1 %	0,0422
DMSO 25 µM	12,35 ± 6,39		
Lalistat 50 µM	1,19 ± 1,02	87,7 %	< 0,0001
DMSO 50 µM	9,67 ± 1,61		

4.3 Untersuchung des adjuvanten Effektes der Inhibition der sauren Lipase auf Tamoxifen in einem Tamoxifen-resistenten Zellmodell

Für die adäquate Behandlung des Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebses stehen Aromatasehemmer und SERMS wie Tamoxifen zur Verfügung. Tamoxifen wird dabei leitliniengerecht für mindestens 5 Jahre empfohlen. Auch dieser lange Einnahmezeitraum spielt eine Rolle bei der therapielimitierenden, klinisch bedeutsamen Resistenzentwicklung gegen Tamoxifen.

Als Ergänzung des Brustkrebstherapieregimes wurde der Effekt der Inhibition der sauren Lipase durch Lalistat auch auf den Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs speziell im klinisch relevanten Tamoxifen-resistenten Brustkrebs untersucht. Hierbei wurde zum einen die MCF-7 Zelllinie als Hormonrezeptor-positives Brustkrebs Zellmodell gewählt. Zusätzlich wurde eine kommerziell erworbene Tamoxifen-resistente Zelllinie verwendet.

4.3.1 Tamoxifen-induzierte Apoptose/Zelltod

Zur Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf Tamoxifen wurden die Tamoxifen-sensiblen und die Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen 24 h nach ihrer Aussaat für drei Tage mit jeweils 10 und 25 μM Lalistat präinkubiert. Anschließend folgte eine dreitägige Koinkubation mit Lalistat- und Tamoxifen-Konzentrationen zwischen 0,4 und 100 μM . Die Zellviabilität wurde dann mit dem CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay bestimmt. Als Messgröße diente hierbei die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}). Der IC_{50} -Wert beschreibt die Konzentration eines Inhibitors, bei der die Hälfte der möglichen Hemmung erreicht wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die adjuvante Therapie von Lalistat in den Konzentrationen 10 und 25 μM in Kombination mit einer Tamoxifen-Behandlung zu einer signifikanten Erniedrigung der Zellviabilität im Hormonrezeptor-positiven Zellmodell führt. Auch im Tamoxifen-resistenten Brustkrebs konnte ein adjuvanter Effekt nachgewiesen werden.

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Tamoxifen-resistenten Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten MCF-7 Zellen eine höhere Sensibilität auf die Lipaseinhibition zeigen.

In der Abbildung 4.15 ist jeweils für 10 und 25 μM Lalistat die Dosis-Wirkungskurve in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

In der Tabelle 4.4 sind die IC_{50} -Werte einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung und Signifikanzwert dargestellt.

Die Hinzugabe von Lalistat zu Tamoxifen führt in Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der IC_{50} von 41,1 % (Lalistat 10 μM) bis 52,8 % (Lalistat 25 μM).

Für den Vergleich der verschiedenen Konzentrationen von Lalistat untereinander und DMSO untereinander ließ sich für die IC_{50} -Werte gemäß Anova Analyse kein statistischer Unterschied nachweisen.

Tamoxifen-resistente MCF-7

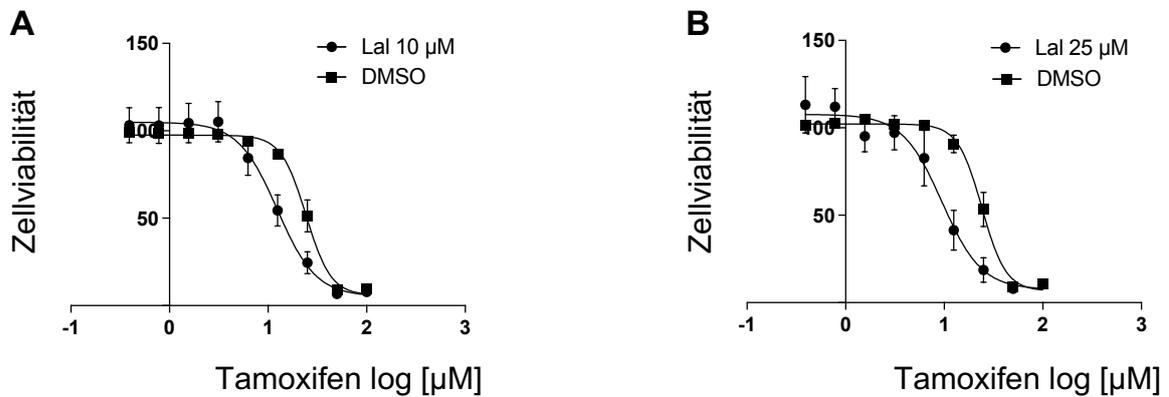


Abbildung 4.15: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen mit Tamoxifen

Tamoxifen-resistente MCF-7 Zellen wurden 24 h nach Aussaat für drei Tage mit 10 µM (A) und 25 µM (B) präinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für drei Tage mit einer Tamoxifen-Konzentration von 0,4-100 µM inkubiert. Mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wurde dann die Zellviabilität bestimmt, eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und die IC_{50} berechnet. Zur besseren graphischen Übersicht sind die Tamoxifen-Konzentrationen logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen. Die Werte wurden auf die geringste Tamoxifen-Konzentration normalisiert, um Plattenrandeffekten entgegenzuwirken, $n = 12$ (A), $n = 13$ (B). Negativkontrollen mit DMSO wurden äquivalent zu jedem Versuch durchgeführt.

Tabelle 4.4: Übersicht der IC_{50} -Werte von Lalistat und DMSO in Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen

Die abgebildete Tabelle stellt die IC_{50} -Werte in mikromolar von 10 und 25 µM Lalistat und DMSO, als Zusammenfassung aus drei unterschiedlichen Versuchen, einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$), dar. Der Mittelwert ist berechnet aus der IC_{50} der drei Einzelversuche. Die statistische Signifikanz zwischen Lalistat und DMSO ist als P-Wert angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: $p > 0,05$: nicht signifikant (n.s.), $p < 0,05$: signifikant.

	IC_{50} [µM] ± SD	IC_{50} Reduktion [%]	P-Wert Δ
Lalistat 10 µM	12,12 ± 3,76	41,1 %	0,0035
DMSO 10 µM	20,56 ± 8,11		
Lalistat 25 µM	9,36 ± 4,26	52,8 %	0,0003
DMSO 25 µM	19,81 ± 7,71		

Um das Ergebnis für die Behandlung von Tamoxifen-resistenten MCF-7 abgleichen zu können, wurde im Folgenden der synergistische Effekt von Lalistat auf Tamoxifen-sensible MCF-7-Zellen untersucht.

Bei Hinzugabe von Lalistat zu Tamoxifen in den Tamoxifen-sensiblen MCF-7 Zellen kann je nach Lalistat-Konzentration die IC_{50} von 18,6 % (Lalistat 10 μ M) bis 42,7 % (Lalistat 25 μ M) gesenkt werden.

Für 25 μ M Lalistat war der Unterschied zur Kontrolle statistisch signifikant.

Für den Vergleich der verschiedenen Konzentrationen von Lalistat untereinander und DMSO untereinander ließ sich für die IC_{50} -Werte gemäß Anova Analyse kein statistischer Unterschied nachweisen.

Tamoxifen-sensible MCF-7

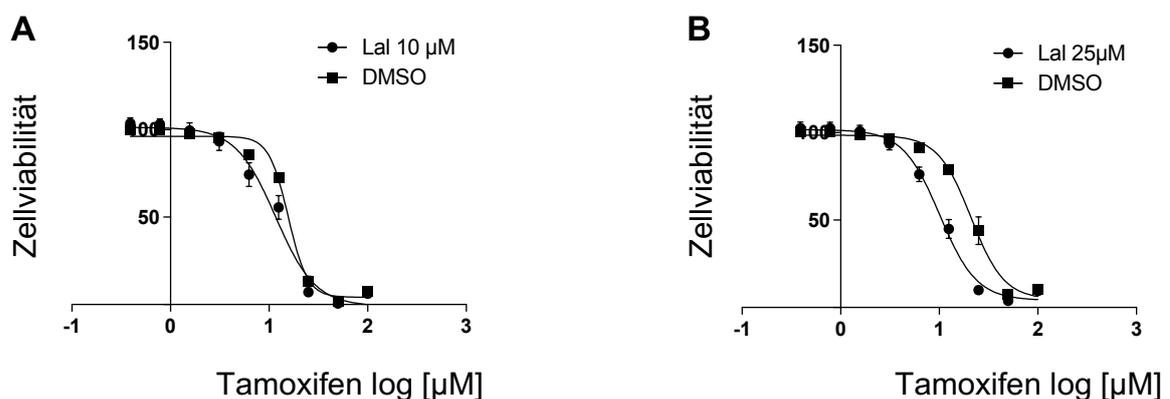


Abbildung 4.16: Adjuvanter Effekt von Lalistat auf die Behandlung von MCF-7 Zellen mit Tamoxifen

MCF-7 Zellen wurden 24 h nach Aussaat für drei Tage mit 10 μ M (A) und 25 μ M Lalistat (B) präinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für drei Tage mit einer Tamoxifen-Konzentration von 0,4-100 μ M inkubiert. Mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wurde dann die Zellviabilität bestimmt, eine Dosis-Wirkungskurve erstellt und die IC_{50} berechnet. Zur besseren graphischen Übersicht sind die Tamoxifen-Konzentrationen logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen. Die Werte wurden auf die geringste Tamoxifen-Konzentration normalisiert, um Plattenrandeffekten entgegenzuwirken, n = 13 (A), n = 17 (B). Negativkontrollen mit DMSO wurden äquivalent zu jedem Versuch durchgeführt.

Tabelle 4.5: Übersicht der IC₅₀-Werte von Lalistat und DMSO in MCF-7 Zellen

Die abgebildete Tabelle stellt die IC₅₀-Werte in mikromolar von 10 und 25 µM Lalistat und DMSO, als Zusammenfassung aus drei unterschiedlichen Versuchen, einschließlich der Mittelwerte mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$), dar. Der Mittelwert ist berechnet aus der IC₅₀ der drei Einzelversuche. Die statistische Signifikanz zwischen Lalistat und DMSO ist als P-Wert angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test errechnet, dabei gilt: $p > 0,05$: nicht signifikant (n.s.), $p < 0,05$: signifikant.

	IC₅₀ [µM] ± SD	IC₅₀ Reduktion [%]	P-Wert Δ
Lalistat 10 µM	19,56 ± 9,23	18,6 %	0,2665
DMSO 10 µM	24,03 ± 10,66		
Lalistat 25 µM	16,31 ± 9,18	42,7 %	0,0020
DMSO 25 µM	28,48 ± 11,77		

5 Diskussion

Aktuell beinhaltet die Brustkrebstherapie, abhängig vom jeweiligen Brustkrebssubtyp, neben der operativen Entfernung, unterschiedliche Möglichkeiten der adjuvanten Systemtherapie wie beispielsweise die Chemo- und die endokrine Therapie. Durch dosislimitierende Nebenwirkungen und relevante Resistenzentwicklungen ergibt sich dennoch ein zunehmender Bedarf an spezifischen therapeutischen Targets.

Eine besondere Rolle bei der Erforschung neuartiger adjuvanter Wirkstoffe in der Brustkrebstherapie spielt der veränderte Lipidmetabolismus im Tumor. Insbesondere in Patientinnen mit triple-negativem Phänotyp konnten erhöhte Lipid Plasmaspiegel gefunden werden [131]. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass der Bedarf dieser neutralen Lipide im triple-negativen Phänotyp vor allem durch die exogene Aufnahme von Lipiden bedient wird, während im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs eher von einer erhöhten endogenen Lipidsynthese ausgegangen wird [81]. Die insgesamt im Tumor erhöhte Aufnahme und Speicherung dieser neutralen Lipide ist assoziiert mit einer vermehrten Tumorzellproliferation und einem höheren Aggressivitätspotential [132].

Um den tumorspezifischen Mechanismus der Lipidspeicherung und -verwertung zu adressieren, stellt die spezifische Inhibition der lysosomalen sauren Lipase einen neuartigen therapeutischen Ansatz dar. Die saure Lipase hydrolysiert intrazellulär die über Endozytose aufgenommenen neutrale Lipide am Lysosom [105], die dann entweder durch die Zelle weiter verwertet oder in Form von sogenannten Lipidtropfen zur späteren Verwertung durch die Zelle gespeichert werden können. Da die lysosomale saure Lipase bisher das einzig bekannte Enzym ist, das die neutralen Lipide durch Hydrolyse für eine weitere Verwertung durch die Zelle bereitstellt, ergibt sich ein potentiell neuartiges Target in der spezifischen Therapie des Brustkrebses.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung adjuvanter Effekte der Lipaseinhibition mit dem Lipasehemmer Lalistat auf Doxorubicin, Paclitaxel und Tamoxifen als relevante Wirkstoffe in der Systemtherapie des Brustkrebses in drei verschiedenen experimentellen Ansätzen zur potentiellen Erweiterung des aktuell zugelassenen Therapiespektrums im Brustkrebs.

Bereits in den letzten Jahren ist der dysregulierte Lipidstoffwechsel im Brustkrebs zunehmend in den Fokus der Tumorforschung gerückt [133]. In einer Studie von Lo et al. wurde beispielsweise gezeigt, dass die Expression der endothelialen Lipase im TNBC deutlich hochreguliert ist [134, 135]. Die endotheliale Lipase gehört zu einer Gruppe von extrazellulären Lipasen, die die Hydrolyse von Lipoproteinen katalysiert, um die Aufnahme der Lipide in die Zelle zu ermöglichen [134]. Dabei scheint die Überexpression der endothelialen Lipase im triple-negativen Brustkrebs mit der vermehrten Tumorzellproliferation und einem erhöhten Stammzellcharakter zu korrelieren [134, 135].

Auch das neuartige Konzept der Lipasehemmung als Therapieansatz im Brustkrebs wurde in diesem Zusammenhang in der Literatur bereits beschrieben. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Inhibition der endothelialen Lipase zu einer Inhibition des Tumorzellwachstums, aber auch zu einer signifikanten Reduktion des Stammzellcharakters in den untersuchten Brustkrebszellen führte [136].

Auch die Lipoproteinlipase, als Bestandteil der oben genannten (o.g.) Gruppe von extrazellulären Lipasen, wurde in einer Studie von Manupati et al. als potentiell neuartiges Target in der adjuvanten Brustkrebstherapie bereits untersucht [137]. Eine erhöhte Expression der Lipoproteinlipase scheint im TNBC mit einem insgesamt schlechteren Outcome assoziiert zu sein und auch in dieser Studie wurde der potentielle Effekt einer Lipasehemmung im Brustkrebs geprüft [137]. In der erwähnten Studie schien die Inhibition der Lipoproteinlipase zu einer signifikanten Verminderung von stammzellassoziierten Charakteristika wie der Tumorzellproliferation und Invasivität zu führen [137].

5.1 Doxorubicin

Leitliniengerecht besteht die Therapie des triple-negativen Brustkrebses aus der Kombination aus einem Anthracyclin und einem Taxan für 18-24 Wochen [16].

Doxorubicin aus der Gruppe der Anthracycline interkaliert mit der DNA und weist dosisabhängig über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ein stark kardiotoxisches Nebenwirkungsprofil auf [51].

Eine potentielle Dosisreduktion von Doxorubicin durch adjuvante Gabe nicht toxischer Wirkstoffe wie Lalistat 2 als Lipasehemmer stellt einen potentiellen therapeutischen Vorteil dar, um dosisabhängige Nebenwirkungen im Rahmen der Systemtherapie zu minimieren.

In dieser Arbeit sollte daher in einem ersten Versuchsansatz untersucht werden, ob die adjuvante Lipasehemmung zu einer signifikanten und dosisabhängigen Erhöhung der Anthracyclin-induzierten Apoptose und Antiproliferation im triple-negativen Zellmodell führt.

5.1.1 Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Anthracyclin-induzierte Apoptose

Um den adjuvanten Effekt der Lipaseinhibition auf die Anthracyclin-induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden die triple-negativen Brustkrebszellen 24 Stunden nach ihrer Aussaat für drei Tage mit Lalistat und einer Kontrolle präinkubiert. Nach sechstägiger Koinkubation mit verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen wurde die mittlere inhibitorische Konzentration mit Hilfe des CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assays bestimmt. Der Versuchsaufbau unterscheidet sich damit leicht vom Aufbau der anderen durchgeführten Zellviabilitätsassays. Statt der sonst üblichen Inkubationszeit von drei Tagen wurden in diesem Versuchsaufbau die Zellen für sechs

Tage mit Doxorubicin kokubiert, da sich die Toxizität von Doxorubicin in einem dreitägigen Versuchssetting als nicht ausreichend erwiesen hat.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lalistat als spezifischer Inhibitor der lysosomalen sauren Lipase einen adjuvanten Effekt auf die Anthracyclin-Behandlung im triple-negativen Zellmodell zeigt. In den Dosis-Wirkungskurven der Versuche, s. Abbildung 4.1, ist ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität zwischen den Lalistat-Konzentrationen 5, 10, 25 und 50 μM im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Dieser ist bei Lalistat-Konzentrationen von 50 μM am stärksten ausgeprägt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen demnach darauf hin, dass die adjuvante Lipasehemmung mit Lalistat 2 die Chemosensitivität von MDA-MB-231 Zellen gegenüber Doxorubicin erhöht. Als Erklärungsansatz hierfür sind mehrere relevante Aspekte denkbar, beispielsweise der Einfluss von Lalistat auf den erhöhten Lipidmetabolismus im Brustkrebs, den erhöhten Stammzellcharakter und damit auch einhergehend die vermehrte Chemoresistenz. Die genannten Faktoren werden im Folgenden erläutert.

Lipidmetabolismus

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben konnte im Brustkrebs eine Erhöhung des Lipidmetabolismus nachgewiesen werden.

Die neutralen Lipide, Triglyceride und Cholesterinester, werden nach Aufnahme durch die Tumorzelle im Lysosom durch die lysosomale saure Lipase zu freien Fettsäuren und Cholesterinen hydrolysiert und können dann anschließend entweder in Form von Lipidtropfen am endoplasmatischen Retikulum gespeichert oder direkt durch die Zelle weiter verwertet werden z.B. als Membranbestandteile, s. Abbildung 1.1 [118].

Zunächst können zwei verschiedene Wege der Lipidakkumulierung unterschieden werden. Zum einen können Tumorzellen über die de-novo Synthese, auch zusammengefasst unter dem Begriff des lipogenetischen Phänotyps, vermehrt Lipide akkumulieren [73]. Zum anderen wurde insbesondere im TNBC eine erhöhte exogene Lipidaufnahme, zusammengefasst unter dem Begriff des Lipid-akkumulierenden Phänotyps, beobachtet [73].

Da die saure Lipase aktuell in der Literatur das einzig bekannte Enzym ist, was die Lipide nach Aufnahme durch die Zelle spaltet und so die weitere Verwertung durch die Zelle ermöglicht, kommt es durch Hemmung der LAL potentiell zu einer Zunahme der Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin, indem wichtige Funktionen der Lipide für die Tumorzelle blockiert werden.

Tumorstammzellcharakter

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Beobachtung, dass Lalistat 2 als spezifischer Inhibitor der sauren Lipase die Chemosensitivität in triple-negativen Zellen signifikant erhöht, ist die Reduktion des Tumorstammzellcharakters im Rahmen der Lipasehemmung. Im Brustkrebs, insbesondere im triple-negativen Phänotyp, konnte ein erhöhter Stammzellcharakter nachgewiesen werden, der wesentlich zur Tumorpheriferation und -progression beiträgt [94].

Es konnte gezeigt werden, dass das in der Beta-Oxidation entstehende Acetyl-CoA durch Induktion zellulärer Prozesse wesentlich zur Aufrechterhaltung eines erhöhten Tumorstammzellcharakters im Brustkrebs beiträgt [103, 138]. Beispielsweise kann über Produkte der Fettsäureoxidation, NADH und FADH₂, oxidativer Stress in den Zellen vermindert werden und gleichzeitig die ATP-Produktion erhöht werden [103, 138]. Auch in hämatopoetischen Zellen wird eine Erhöhung des Stammzellcharakters durch eine vermehrte Fettsäureoxidation beschrieben, sodass umgekehrt die Hemmung der Fettsäureoxidation zur Reduktion des Tumorstammzellcharakters führt [139]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ein erhöhter Gehalt an Lipidtropfen im Brustkrebs auch mit einem erhöhten Stammzellgehalt im TNBC einhergeht [140].

Chemoresistenz

Eine weitere Möglichkeit für die beobachteten Effekte von Lalistat 2 auf MDA-MB-231 Zellen könnte in der mit der Lipasehemmung einhergehenden Reduktion der Chemoresistenz liegen.

Der im Brustkrebs erhöhte Lipidmetabolismus, verbunden mit einer erhöhten Fettsäureoxidation, führt im Brustkrebs zu einer Verstärkung der Chemoresistenz, sodass bei Inhibition der Fettsäureoxidation eine Chemosensitivierung im Brustkrebs beobachtet werden konnte. Eine Theorie ist, dass durch die vermehrte Fettsäureoxidation Tumorzellen vermehrt Energie trotz erhöhter Stressbedingungen, wie beispielsweise unter Chemotherapie, produzieren können [141] [103].

Ein weiterer Aspekt, der im Brustkrebs zur Chemoresistenzentwicklung beiträgt, ist der o.g. erhöhte Stammzellcharakter. In der Literatur werden unterschiedliche Gründe für die Chemoresistenz von Krebsstammzellen beschrieben. Dazu zählen unter anderem die Epithelial-mesenchymale Transition oder die Tumormikroumgebung [142].

Daher kann davon ausgegangen werden, dass Lalistat über die Inhibition des Lipidstoffwechsels mit einhergehender Reduktion des Tumorstammzellcharakters zu einer Reduktion der Chemoresistenz im Brustkrebs führt.

Es lässt sich also festhalten, dass durch die Hemmung der lysosomalen sauren Lipase aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Aufspaltung von neutralen Lipiden und der durch ihre Hemmung deutlich weniger zur Verfügung stehenden freien Fettsäuren prokanzerogene Mechanismen unterdrückt werden. Hierzu zählt unter anderem die Beta-Oxidation in den Mitochondrien mit daraus vermindert freigesetzter Energie und entscheidend für den Erhalt der hohen Stammzeleigenschaften sowie weniger Speicherung von Lipiden in Lipidtropfen. Das erklärt potentiell die Zunahme der Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin, die in dieser Arbeit beobachtet wurde.

5.1.2 Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase auf die Anthracyclin-induzierte Antiproliferation

Um zusätzlich zur Apoptose auch den adjuvanten Effekt der Lipaseinhibition auf die Anthracyclin-induzierte Antiproliferation zu untersuchen, wurden MDA-MB-231 Zellen 24 Stunden nach ihrer Aussaat für sechs Tage mit Lalistat oder einer DMSO-Kontrolle und einer Doxorubicin-Verdünnungsreihe inkubiert. Anschließend folgte die Messung der mittleren inhibitorischen Konzentration mit Hilfe des CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lalistat 2, als spezifischer Inhibitor der sauren Lipase, zusätzlich zum oben beschriebenen Effekt auf die Apoptose auch einen adjuvanten Effekt auf die Anthracyclin-induzierte Antiproliferation im triple-negativen Zellmodell zeigt. In einem Konzentrationsbereich von 0-780 nM Doxorubicin konnte unter Lalistat im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden, die nach Ausschluss zytotoxischer Effekte potentiell auf eine Verstärkung der Doxorubicin-induzierten Antiproliferation zurückgeführt werden konnte, s. Abbildungen 4.3.

Doxorubicin gehört zu der Gruppe der Anthracycline und führt über Interkalation mit der DNA zu Strangbrüchen, resultierend im Zelltod [49]. Zusätzlich hemmt Doxorubicin aber auch die Proliferation von Tumorzellen, indem über die Spaltung eines Transkriptionsfaktors die Replikation im Zellzyklus gestoppt wird [143].

Durch Hemmung der sauren Lipase kommt es in Tumorzellen vermutlich zur Unterdrückung von verschiedenen prokanzerogenen Mechanismen, wie beispielsweise einem erhöhten Tumorstammzellcharakter und einem erhöhten Lipidstoffwechsel. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Lipasehemmung in der adjuvanten Brustkrebstherapie auch den prokanzerogenen Mechanismus der Tumorzellproliferation reduzieren kann.

Die Proliferation von Tumorzellen als essentiell malignitätsbestimmender Prozess geht gleichzeitig mit einem gesteigerten Bedarf an Lipiden einher, die z.B. in Form von Membranbestandteilen genutzt werden können, um die Wachstumsrate und Zellstabilität im Tumor zu steigern [144]. Das bedeutet, dass eine Verstärkung des Lipidstoffwechsels im Tumor über die demnach gesteigerte Verfügbarkeit von Lipiden auch ein gesteigertes Tumorzellwachstum ermöglicht. Über die Lalistat spezifische Hemmung der Lipidspaltung im Lysosom kann eine weitere Lipidverwertung durch die Tumorzelle deutlich reduziert werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch Lalistat antiproliferative Effekte aufweist.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Lipasehemmung mit Lalistat 2 synergistische Effekte auf die Doxorubicin-induzierte Antiproliferation zeigt. Der Synergismus kann dadurch begründet werden, dass sowohl Lalistat für sich über Hemmung der Lipidverwertung als auch Doxorubicin isoliert über Spaltung eines Transkriptionsfaktors Effekte auf die Antiproliferation in Brustkrebszellen zeigt.

5.2 Paclitaxel

In der Polychemotherapie des triple-negativen Brustkrebses spielt neben Doxorubicin auch Paclitaxel als Taxan eine wichtige Rolle.

In vorherigen Untersuchungen konnte für die adjuvante Lipasehemmung mit Lalistat 2 und Paclitaxel bereits eine signifikant erhöhte Apoptoseinduktion im triple-negativen Zellmodell nachgewiesen werden [116].

Die aktuelle Leitlinie empfiehlt für die Kombinationschemotherapie jedoch eine mehrmonatige Paclitaxel-Gabe, sodass in dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob Lalistat als Lipaseinhibitor eine vergleichbare Wirkung in der adjuvanten Behandlung von Langzeit-Paclitaxel behandelten triple-negativen Zellen zeigt wie in den nicht vorbehandelten Brustkrebszellen.

5.2.1 Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zelllinie

Zur Entwicklung einer Langzeit-Paclitaxel behandelten Zelllinie wurden die MDA-MB-231 Zellen für insgesamt 7 Monate mit steigenden Konzentrationen Paclitaxel inkubiert und anschließend zur Homogenisierung der Zellpopulation einzelne Zellklone kultiviert, s. Kapitel 3.3.2. Als Grundlage für die Entwicklung der Zelllinie diente die Modifikation von zwei bereits etablierten Studienprotokollen, in denen sich letztlich über die intermittierende Paclitaxel-Behandlung eine Resistenz der Zellen gegenüber Paclitaxel entwickelte [123, 124]. Zwar konnte in den wie beschrieben behandelten Zellklonen nach 7 Monaten keine Resistenzentwicklung nachgewiesen werden, es zeigte sich aber nach Abschluss der Paclitaxel-Behandlung mikroskopisch eine deutliche Morphologieveränderung der MDA-MB-231 Zellen.

Auch in der Literatur sind morphologische Veränderungen als Reaktion auf die Paclitaxel-Behandlung in verschiedenen Tumorzellen beschrieben worden.

In einer Untersuchung von Jia et al. wurden beispielsweise Ovarialkarzinomzellen für mehr als 4 Monate nach Paclitaxel-Behandlung auf morphologische Veränderungen beobachtet [145]. Dabei wurde eine Zellveränderung von einem ursprünglich epithelialen Phänotyp der Ovarialkarzinomzellen hin zu einem eher fibroblastenähnlichen Phänotyp in Form von abgerundeten, vergrößerten Zellstrukturen beschrieben [145].

Weitere vergleichbare Beobachtungen von zellulären morphologischen Veränderung nach langfristiger Paclitaxel-Behandlung fehlen in der Literatur, stattdessen werden Untersuchungen beschrieben, die zumindest kurzfristig eine Änderung der Morphologie nach Paclitaxel-Behandlung feststellen konnten. In einer Untersuchung von Glioblastom Zellen wurde, ähnlich wie auch in der genannten Studie von Jia et al., beobachtet, dass die Zellen 48 h nach Paclitaxel-Behandlung eine größere, rundlichere Form annehmen und eher unregelmäßig begrenzt sind [146]. Obwohl der zeitliche Rahmen dieser Studie sich somit deutlich vom durchgeführten Behandlungsschema und Beobachtungszeitraum der Langzeit-Paclitaxel behandelten

Zellen unterscheidet, ist zumindest eine ähnliche Tendenz in der Veränderung der zellulären Form nach der Paclitaxel-Gabe zu beobachten.

In Lungenkarzinomzellen, die mit Paclitaxel behandelt wurden, konnte morphologisch eine Zellschwellung und eine zytoplasmatische Vakuolisierung beobachtet werden, die mit steigenden Paclitaxel-Konzentrationen zunahm [147].

Die o.g. Untersuchung der Glioblastomzellen äußert als Erklärungsansatz für die deutlich sichtbare Veränderung der Zellmorphologie die Vermutung, dass die Wirkung von Paclitaxel auf den Spindelapparat der Mitose eine Rolle spielen könnte. Paclitaxel verhindert über Bindung an die Beta-Tubulin-Untereinheit den Abbau der Mikrotubuli als wichtiger Bestandteil für die zellulären Formgebung [47, 146].

Eine weitere Vermutung für die deutlich morphologischen Veränderungen der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen ist, dass Paclitaxel die zelluläre Differenzierung hin zu einem weniger aggressiven Phänotyp induziert. Die vermehrten Zell-Zell Kontakte und ein verstärktes epitheliales Zellbild in den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen könnten dabei Hinweise für den Differenzierungsprozess sein. Diese These wird durch die Untersuchung von Jia et al. unterstützt, die zeigen konnte, dass die Paclitaxel-Behandlung die Differenzierung der Ovarialkarzinomzellen zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp unterstützt [145]. Ähnlich wie die Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen zeigten die Ovarialkarzinomzellen als Reaktion auf die Paclitaxel-Behandlung eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit, s. Abbildung 4.5, und eine veränderte Expression von E-Cadherin und Vimentin [145].

In MCF-7 Zellen führt die Paclitaxel-Behandlung zu morphologischen Veränderungen und einer Zelldifferenzierung hin zu benignen Stromazellen [148]. Zudem zeigten die Zellen ein verlangsamtes Wachstum, analog den Beobachtungen dieser Arbeit [148]. Zusätzlich wird die Theorie einer zellulären Differenzierung dadurch gestützt, dass, anders als in den durchgeführten Protokollen [123, 124] zur Langzeit-Paclitaxel-Behandlung der MDA-MB-231 Zellen, nach 7 Monaten intermittierender Paclitaxel-Gabe keine signifikante Resistenzentwicklung gegenüber dem Chemotherapeutikum nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die langfristig niedrigdosierte Paclitaxel-Behandlung in triple-negativen Brustkrebszellen zu morphologischen Veränderungen der Zellen führt, die eventuell durch die Induktion einer zellulären Differenzierung durch Paclitaxel erklärt werden kann. Da jedoch die morphologische Veränderung der Zellen alleine nicht ausreichend Informationen zur umfassenden Beurteilung dieser Hypothese bietet, wurden in dieser Arbeit weitere Charakteristika der behandelten Zellklone beurteilt, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert und diskutiert werden.

5.2.2 Wachstumsverhalten der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone

Um das Wachstumsverhalten der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone zu beurteilen, wurden die Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Mittels CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay wurde dann zu verschiedenen Zeitpunkten eine Zellviabilitätsmessung durchgeführt.

Bereits nach 24 h war ein signifikanter Unterschied in der Anzahl gemessener Zellen zwischen der Kontrolle und den getesteten Zellklonen messbar. Nach 48 h zeigten die unbehandelten Zellen dann ein fast doppelt so hohes relatives ATP-Level im Vergleich zu den Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen.

Die Zellviabilitätsmessung mit Hilfe des CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assays beruht auf der Messung von ATP als Zeichen für metabolisch aktive Zellen [121], das bedeutet, je höher der Anteil viabler Zellen pro Messzyklus ist, desto höher ist auch das ATP-Signal. So kann indirekt über die Messung des zellulären ATP-Signals auf die Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Zellen geschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf Grund des nach 48 h signifikant niedrigeren ATP-Levels der Zellklone darauf hin, dass eine langfristig niedrig dosierte Paclitaxel-Behandlung die triple-negativen Brustkrebszellen in ihrem Wachstumsverhalten hemmt. Da die Kontrolle und die Zellklone ansonsten unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, können andere Ursachen für die Unterschiede im Wachstumsverhalten näherungsweise zunächst vernachlässigt werden.

Paclitaxel gehört zur Gruppe der Taxane und führt über Eingriff in die Mitose zum Zellzyklusarrest, resultierend in Apoptose [47]. Zusätzlich hemmt Paclitaxel nachweislich die Proliferation von Brustkrebszellen [149], sodass zunächst davon ausgegangen werden kann, dass eine langfristig niedrig dosierte Paclitaxel-Behandlung die Zellproliferation im Vergleich zu nicht behandelten Brustkrebszellen verlangsamt.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellklone beschäftigt sich mit dem veränderten Stammzellcharakter der Langzeit-Paclitaxel behandelten Brustkrebszellen, s. Abbildung 4.6 und 4.7. Es ist eine signifikante Reduktion des CD44/CD24 Verhältnisses und des Stammzellmarkers ALDH1 in den behandelten Zellklonen zu beobachten.

In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Stammzellcharakters und einer erhöhten Proliferationsrate in Tumorzellen nachgewiesen werden. So ist beispielsweise im Bronchialkarzinom die Überexpression des Stammzellmarkers CD44 mit einer verstärkten Tumorzellproliferation assoziiert, die umgekehrt bei Suppression von CD44 zum Stillstand zu kommen scheint [150, 151].

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Zellklone eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit zeigen, als die unbehandelte Kontrolle. Dies lässt sich vermutlich zum einen durch die nachgewiesene antiproliferative Wirkung von Paclitaxel erklären. Zum anderen liegt jedoch auch die Vermutung nahe, dass die

Reduktion des Stammzellcharakters als Reaktion auf die langfristig niedrig dosierte Paclitaxel-Behandlung auch zu einer Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit in den Zellklonen führt. Da die Proliferation ein relevantes Charakteristikum von malignen Zellen ist [152], deutet die verminderte Proliferationsrate der Zellklone gleichzeitig auch auf die Verminderung des Aggressionspotentials der Tumorzellen hin. Ob die langfristig niedrig dosierte Paclitaxel-Behandlung so auch langfristig zu einer Verminderung der Malignität der Tumorzellen führt, muss im Folgenden weiter diskutiert werden.

5.2.3 Molekulare Charakterisierung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone

Um die Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen molekular näher anhand der Expression verschiedener relevanter Gene zu charakterisieren, wurden mehrere qPCR-Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden die im Folgenden genannten Gene jeweils für den Zellklon A3 und eine Kontrolle untersucht.

Die oben bereits genannten morphologischen Veränderungen und die nachweislich verlangsamte Proliferationsrate der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen sind möglicherweise durch die Induktion einer zellulären Differenzierung durch die Paclitaxel-Behandlung erklärbar. Differenzierung bedeutet in diesem Fall, dass die Tumorzellen sich in weniger aggressive Zellen mit veränderten molekularen Eigenschaften umwandeln.

Stammzellmarker

Zunächst wurde zur Untersuchung des Stammzellcharakters das Verhältnis von CD44/CD24 und die Expression von ALDH1 untersucht. Die Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellklone zeigten dabei eine signifikant geringere Expression der Stammzellmarker.

Die Expression eines höheren CD44/CD24-Verhältnis wurde als ein entscheidendes Differenzierungsmerkmal zwischen tumorfördernden und nicht tumorfördernden Zellpopulationen identifiziert [153, 154], sodass davon ausgegangen werden kann, dass ein geringerer Stammzellcharakter in den behandelten Zellklonen potentiell auch zu einer Verminderung der charakteristischen Tumorzelleigenschaften führt. Tumorzellen, die einen höheren Stammzellcharakter als andere Zellen aufweisen, zeigen ein insgesamt höheres Malignitätspotential in Hinblick auf die Krebsentstehung und -entwicklung. Dabei ist das Verhältnis von CD44/CD24 vor allem mit einer erhöhten Proliferationsrate und einem vermehrten Tumorwachstum assoziiert [154]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CD44 und somit der Verlust eines erhöhten Stammzellcharakters zur Differenzierung der Stammzellen mit Reduktion der Proliferationsrate führt [155]. Zudem konnte gezeigt werden, dass der CD44-Verlust zu einer Chemosensitivierung gegenüber Doxorubicin führt [156].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Stammzellcharakter der behandelten Zellklone sinkt, sodass über diesen Prozess der Differenzierung vermutlich auch die Aggressivität der Zellklone sinkt.

E-Cadherin

Auf Grund der deutlichen morphologischen Veränderungen der Zellklone nach siebenmonatiger Paclitaxel-Behandlung, s. Abbildung 4.4, wurde die Expression von E-Cadherin untersucht. Dabei zeigen die behandelten Zellklone im Vergleich zur unbehandelten Zellkontrolle eine signifikant erhöhte Expression von E-Cadherin.

E-Cadherin spielt als Adhäsionsmolekül auf der Zelloberfläche eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten und eine Reduktion der E-Cadherin Expression in Tumorzellen ist vermutlich über Auflockerung zellulärer Kontakte mit einer vermehrten Metastasierungstendenz assoziiert [128].

In unterschiedlichen Tumorentitäten, wie unter anderem dem Brustkrebs, konnte eine relevante Reduktion der E-Cadherin Expression nachgewiesen werden [157]. Zusätzlich scheint die reduzierte E-Cadherin Expression im Brustkrebs mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert zu sein [158]. Diese scheinbare Korrelation aus einer verminderten E-Cadherin Expression und dem vermehrten Auftreten von Metastasen einhergehend mit einer schlechteren Prognose konnte insbesondere auch im triple-negativen Brustkrebs beobachtet werden [159].

Da E-Cadherin von den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen verstärkt exprimiert wird, lässt sich zusammenfassend festhalten, dass es durch die mehrmonatige Paclitaxel-Behandlung potentiell zu einer Minderung der Malignität über Reduktion der Metastasierungsfähigkeit durch Stärkung der Zell-Zell-Kontakte in den Zellklonen kommt. Die o.g. Studie von Jia et al. aus dem Jahr 2012 hat jedoch in Bezug auf die E-Cadherin Expression nach Paclitaxel-Behandlung die Beobachtung gemacht, dass es nach der Paclitaxel-Behandlung zu einer verminderten E-Cadherin Expression zu kommen scheint [145].

Vimentin

Zusätzlich zur Expression von E-Cadherin wurde die Expression von Vimentin in den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellklonen untersucht, die insgesamt eine verminderte Expression zeigen. Vimentin spielt als Intermediärfilament im Rahmen der EMT eine entscheidende Rolle beim zellulären Verlust epithelialer Eigenschaften zugunsten mesenchymaler Charakteristika [129].

Eine erhöhte Vimentin Expression ist insbesondere im triple-negativen Phänotyp mit einer schlechteren Prognose verbunden und mit Charakteristika wie einem geringeren Differenzierungsgrad und einem erhöhten Ki-67 assoziiert [160]. Die Hemmung der Vimentin Expression im Brustkrebs führt gleichzeitig zur Hemmung der Tumorzellmigration [161].

So lässt sich zusammenfassend festhalten, dass durch eine verringerte Expression von Vimentin in den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen die Hypothese der Zelldifferenzierung hin zu einem weniger aggressiven Phänotyp durch Paclitaxel unterstützt wird.

c-Myc

Zur weiteren Charakterisierung der Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen wurde die Expression des Protoonkogens c-Myc untersucht. Dabei zeigen die Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellklone eine verminderte c-Myc Expression im Vergleich zur unbehandelten Zellkontrolle.

Die erhöhte Expression von c-Myc wurde in verschiedenen Brustkrebssubtypen gefunden [162] und bei Inhibition der erhöhten c-Myc Expression im Brustkrebs kam es nachweislich zu einer reduzierten Migration von triple-negativen Brustkrebszellen [163]. Zusätzlich scheint die erhöhte Expression von c-Myc zu einer erhöhten Expression des Endothelwachstumsfaktors (VEGF) als wichtiger Bestandteil der Angiogeneseinduktion im Tumor zu führen [164].

Die Ergebnisse einer verminderten c-Myc Expression in den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen stützen die Hypothese der Induktion einer zellulären Differenzierung durch Paclitaxel hin zu einem weniger aggressiven Phänotyp. Die Herabregulation von c-Myc ist im Brustkrebs nachweislich mit einer verringerten Proliferation und Malignität verbunden.

PD-L1

Im Rahmen der Immuntherapie werden in verschiedenen Studien vermehrt PD-L1 Inhibitoren bei Brustkrebspatienten getestet. PD-1 als Rezeptor auf der Oberfläche von B- und T-Zellen hemmt bei Bindung seines Liganden die Aktivität von T-Zellen [54] und wird im Brustkrebs nachweislich vermehrt exprimiert [55]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte PD-L1 Expression im Brustkrebs mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert ist [165]. Die erhöhte Expression von PD-L1 im Tumor führt zu einer stärkeren Antitumorantwort durch das Immunsystem, vermutlich ausgelöst durch die erhöhte Rekrutierung von CD8 positiven T-Zellen, die dann vermehrt Zytokine produzieren und ausschütten [165].

Gleichzeitig gibt es jedoch auch Studien, die eine schlechtere Prognose mit der vermehrten PD-L1 Expression im Brustkrebs assoziieren [166, 167]. Eine andere Studie assoziiert das verbesserte Gesamtüberleben bei PD-L1 Expression im Brustkrebs vor allem mit dem triple-negativen Phänotyp [168]. Diese Beobachtung passt zu den Beobachtungen dieser Arbeit, denn in den behandelten triple-negativen Zellen erhöht sich die PD-L1 Expression als Reaktion auf die Langzeit-Paclitaxel Behandlung. Das stützt die Hypothese der zellulären Differenzierung zu einem weniger aggressiven Phänotyp.

ER

Zuletzt wurde noch die Expression des Östrogenrezeptors untersucht. Dabei zeigen die Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellklone eine fast doppelt so hohe Expression des Östrogenrezeptors im Vergleich zur Kontrolle.

Die Expression des Östrogenrezeptor im Brustkrebs ist mit einem längeren krankheitsfreien Überleben assoziiert [169] und mit geringeren Rezidivraten [170]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten also über die erhöhte Expression des Östrogenrezeptors auch auf eine zelluläre Differenzierung hin.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Langzeit-Paclitaxel-Behandlung der triple-negativen Brustkrebszellen zu einer messbaren molekularen Veränderung der Zellklone führt. Im Vergleich zur Kontrolle nimmt der Stammzellcharakter, die Vimentin und die c-Myc Expression ab, wohingegen die Expression von E-Cadherin, PD-L1 und dem Östrogenrezeptor zunimmt.

Ein Erklärungsansatz für die beobachteten Veränderungen der Zellklone ist die Induktion einer zellulären Differenzierung durch Paclitaxel als Chemotherapeutikum. Andersherum scheint die Differenzierung bei der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen, indem sich über eine Art Neuprogrammierung gesunde Zellen zu Tumorzellen differenzieren, die dann den Krebs auslösen [171]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel in sehr geringen Konzentrationen die Differenzierung von myeloischen Zellen zu dendritischen Zellen induziert [172].

5.2.4 Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase mit Paclitaxel in einem Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellmodell

Um den adjuvanten Effekt der Inhibition der sauren Lipase auf Langzeit-Paclitaxel behandelte Zellen zu untersuchen, wurden die Zellklone 24 Stunden nach ihrer Aussaat für drei Tage mit Lalistat und einer Kontrolle präinkubiert. Anschließend folgte die dreitägige Koinkubation mit verschiedenen Paclitaxel-Konzentrationen. Die mittlere inhibitorische Konzentration wurde dann mit Hilfe des CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay bestimmt.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lalistat als spezifischer Inhibitor der sauren Lipase einen adjuvanten Effekt auf die Paclitaxel-Behandlung in Langzeit-Paclitaxel behandelten triple-negativen Brustkrebszellen zeigt. In den Dosis-Wirkungskurven der Versuche, s. Abbildung 4.13 und 4.14, ist ein deutlicher Unterschied in der Zellviabilität zwischen den Lalistat-Konzentrationen 10, 25 und 50 μM im Vergleich zur Kontrolle sichtbar.

Auch bei Betrachtung durchgeführter Vorarbeiten mit nicht Langzeit-Paclitaxel behandelten triple-negativen Zellen [116] ist in den mit Paclitaxel vorbehandelten Zellen eine vergleichbare Wirkung auf die Chemosensitivität zu beobachten.

Lipidmetabolismus

Ein erhöhter und dysregulierter Lipidmetabolismus scheint unter anderem über die Bereitstellung von Membranbestandteilen ein wichtiges Charakteristikum von Tumorzellen zu sein [173, 174].

In den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen konnte eine vergleichbare Sensitivität gegenüber der Lipasehemmung mit Lalistat im Vergleich zu nicht vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen beobachtet werden [116]. Trotz eines potentiell verminderten Lipidstoffwechsels in den behandelten MDA-MB-231 Zellklonen scheint Lalistat als Lipasehemmer eine signifikante Wirkung in den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellklonen zu zeigen.

Stammzellcharakter

Der o.g. Effekt der Chemosensitivierung gegenüber Lalistat beruht unter anderem auf einer Reduktion des Tumorstammzellcharakters durch die Lipasehemmung bei initial erhöhtem Stammzellcharakter [103, 138].

Daher wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die Sensitivität der vorbehandelten Zellen, dass Unterschiede in der Expression von Stammzellmarkern eine Rolle spielen könnten.

Der initiale Stammzellcharakter der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen scheint durch die Induktion der zellulären Differenzierung durch Paclitaxel geringer zu sein, s. Abbildung 4.6 und 4.7. Daraus könnte sich möglicherweise eine leicht geminderte Wirksamkeit der Lalistat-Behandlung auf die Zellen ergeben, die jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Unklar ist aber, ob daraus eine Konsequenz für das Therapieergebnis in der klinisch realen Situation abgeleitet werden könnte.

Da in der Literatur eher davon ausgegangen wird, dass Tumorstammzellen eine relevante Rolle bei der Chemoresistenzentwicklung gegen Therapieformen wie Radiotherapie [175] und Chemotherapie [176] spielen, wäre ursprünglich auch mit einem anderen Ergebnis zu rechnen gewesen. Demnach hätte man bei einem initial niedrigeren Stammzellcharakter der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen eine höhere Chemosensitivierung auf Lalistat erwarten können, sodass eventuell die oben erklärte Reduktion des Lipidstoffwechsels in den Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen die vergleichbare Chemosensitivierung bedingt.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Dasatinib als Tyrosinkinaseinhibitor zu einer relevanten Reduktion von Tumorstammzellen im triple-negativen Brustkrebs und zu einer Differenzierung von Paclitaxel-resistenten Zellen mit einer erhöhten Sensitivität auf Paclitaxel führt [177].

Chemoresistenz

Zusätzlich führt der im Tumor erhöhte Lipidmetabolismus nachweislich zu einer Chemoresistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika [178]. Wenn die Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen durch die Zelldifferenzierung einen weniger aggressiven Phänotyp im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Brustkrebszellen aufweisen, ist potentiell auch der Lipidstoffwechsel in den behandelten Zellen geringer. Bei einer initial höheren Chemoresistenz durch einen erhöhten Lipidmetabolismus wäre dadurch dann auch der Effekt der Lipasehemmung durch Lalistat stärker ausgeprägt als in den langzeitbehandelten Zellen.

Im Vergleich zu bereits durchgeführten Arbeiten weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Lipaseinhibition eine insgesamt ähnliche Wirkung auf die Langzeit-Paclitaxel behandelten MDA-MB-231 Zellen zeigt wie auf nicht vorbehandelten triple-negativen Zellen [116]. Auch hier tragen die o.g. Mechanismen, wie beispielsweise die Hemmung der Lipidverwertung, zu einer Chemosensitivierung gegenüber Lalistat bei. Obwohl Paclitaxel im klinischen Setting oft über mehrere Monate gegeben wird, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine mehrmonatige Therapie mit Paclitaxel keine relevanten Auswirkungen auf die Sensitivität gegenüber Lalistat zeigt. Somit stellt die

adjuvante Lalistat-Behandlung potentiell auch eine therapeutische Möglichkeit für Patientinnen dar, die im Rahmen der Brustkrebsbehandlung bereits über einen längeren Zeitraum eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben.

5.3 Tamoxifen

Fester Bestandteil der Systemtherapie im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs ist laut Leitlinie die endokrine Therapie mit einem SERM wie Tamoxifen oder einem Aromatasehemmer für mindestens fünf Jahre.

Klinisch spielt in diesem Zusammenhang die Resistenzentwicklung gegen Tamoxifen eine größer werdende Rolle.

In dieser Arbeit sollte daher in einem letzten Schritt untersucht werden, ob die adjuvante Lipaseinhibition mit Lalistat 2 einen positiven Effekt in der Tamoxifen-Behandlung im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs zeigt. Der Hauptfokus lag mit Blick auf die klinische Situation auf der Wirkung einer adjuvanten Lipasehemmung im Tamoxifen-resistenten Zellmodell.

5.3.1 Identifikation des adjuvanten Effekts der Inhibition der sauren Lipase mit Tamoxifen in einem Tamoxifen-resistenten Zellmodell

Um den adjuvanten Effekt der Lipaseinhibition auf die Tamoxifen-Behandlung im Tamoxifen-resistenten Zellmodell zu untersuchen, wurden sowohl Hormonrezeptor-positiv MCF-7 Zellen, als auch Tamoxifen-resistente Hormonrezeptor-positiv MCF-7 Zellen 24 Stunden nach ihrer Aussaat für drei Tage mit Lalistat und einer Kontrolle präinkubiert. Anschließend folgte eine dreitägige Koinkubation mit verschiedenen Tamoxifen-Konzentrationen. Die mittlere inhibitorische Konzentration wurde dann mit Hilfe des CellTiter®-Glo Luminescent Cell Viability Assay bestimmt.

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die adjuvante Lalistat-Behandlung im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs gegenüber der Kontrolle zu einer signifikanten Reduzierung der Zellviabilität führt. In den Dosis-Wirkungskurven ist für 10 und für 25 μM ein deutlicher Unterschied zwischen der adjuvanten Lalistat-Behandlung und der Kontrolle sichtbar. Die adjuvante Lalistat-Wirkung war im Tamoxifen-resistenten Zellmodell noch ausgeprägter, s. Abbildung 4.15.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Lalistat über die Lipaseinhibition die Chemosensitivität gegenüber Tamoxifen im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs als auch im Tamoxifen-resistenten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs signifikant erhöht.

Lipidstoffwechsel

Über die Erhöhung des Lipidstoffwechsels halten Tumorzellen ihren Metabolismus und wichtige tumorspezifische Funktionen aufrecht. Lalistat greift als spezifischer Inhibitor der lysosomalen sauren Lipase in diesen Mechanismus ein.

In Tamoxifen-resistenten Zellen konnten Unterschiede im Cholesterol Metabolismus mit einer Erhöhung des Lipidstoffwechsels und einer erhöhten Anzahl an Lipidtröpfchen festgestellt werden [179]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass bei einem initial erhöhten Lipidstoffwechsel in den Tamoxifen-resistenten Zellen die Lipasehemmung einen größeren Einfluss auf das Tumorüberleben hat. So kann potentiell die erhöhte Chemosensitivierung der Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen erklärt werden.

Stammzellcharakter

Die beobachtete Chemosensitivierung der Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen durch die Lipasehemmung beruht wie in den triple-negativen Brustkrebszellen potentiell auch auf einer mit Lalistat bewirkten pharmakologischen Adressierung des erhöhten Tumorstammzellcharakter.

In experimentellen Studien konnte eine Erhöhung des Stammzellcharakters in MCF-7 Zellen als Reaktion auf die Tamoxifen-Behandlung beobachtet werden [180]. Im Gegensatz dazu zeigen Östrogene einen hemmenden Einfluss auf die Expression von Stammzellmarkern und werden in Stammzellen nur geringfügig exprimiert [181].

Diese Beobachtung unterscheidet sich von den Beobachtungen dieser Arbeit, s. Abbildung 4.6 und 4.7, in denen gezeigt wurde, dass eine Langzeit-Paclitaxel Behandlung zu einer Reduktion des Stammzellcharakters in triple-negativen Brustkrebszellen führt.

In einer Studie von Liu et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass die Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen einen höheren Stammzellcharakter aufweisen als die nicht resistenten MCF-7 Zellen [182]. Da die Inhibition der sauren Lipase, wie oben bereits erwähnt, zu einer Reduktion des Tumorstammzellcharakters führt, lässt sich die durch Lalistat-Behandlung induzierte erhöhte Chemosensitivität der Tamoxifen-resistenten MCF-7 Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen erklären.

Chemoresistenz

Ein erhöhter Lipidmetabolismus und ein erhöhter Stammzellcharakter tragen im Brustkrebs zu einer erhöhten Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika bei [142]. Dabei kann im triple-negativen Phänotyp davon ausgegangen werden, dass die adjuvante Lipasehemmung mit Lalistat über die Reduktion eines erhöhten Tumorstammzellcharakters und eines erhöhten Lipidmetabolismus im Tumor zu einer Reduktion der Chemoresistenz führt.

In Tamoxifen-resistenten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen konnte im Vergleich zu nicht resistenten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen ein erhöhter Lipidmetabolismus [179] beobachtet werden sowie auch eine erhöhte Expression des Stammzellcharakters [182]. Dadurch lässt sich vermutlich die erhöhte

Chemosensitivität nach Lalistat-Behandlung in den Tamoxifen-resistenten Zellen erklären.

5.4 Limitationen der Untersuchungen

Die adjuvante Lipaseinhibition durch Lalistat wurde mit Ausnahme der hier erwähnten Untersuchungen mit Paclitaxel im triple-negativen Zellmodell [116] bisher noch nicht untersucht. Daher sind die durchgeführten Versuche dieser Arbeit primär als grundlegende Erweiterung der Lalistat Wirkung im Zellmodell anzusehen und alle beschriebenen Versuche wurden zunächst in *in-vitro* Versuchen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Zellmodell-Versuche lassen sich jedoch nicht automatisch und ohne Einschränkungen auf den menschlichen Körper und die klinische Situation übertragen.

In Kombination mit Doxorubicin und Tamoxifen konnte für die adjuvante Lipasehemmung sowohl im triple-negativen Phänotyp als auch im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs eine signifikante Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden. Die *in-vitro* Untersuchungen vernachlässigen dabei jedoch mögliche Nebenwirkungen und Toxizitäten, die sich aus der adjuvanten Lalistat-Behandlung für den menschlichen Körper ergeben könnten.

Zusätzlich ist nicht bekannt, welche anderen Escape-Strategien der Tumor bei der Lipaseinhibition möglicherweise entwickelt.

Da im klinischen Alltag eine adjuvante Chemotherapie, beispielsweise mit Paclitaxel, oft über mehrere Monate andauert, war die *in-vitro* Langzeit-Paclitaxel-Behandlung die Bemühung, eine möglichst kliniknahe Situation der Brustkrebsbehandlung zu imitieren. Dennoch lässt sich das in dieser Arbeit entwickelte Langzeit-Paclitaxel behandelte triple-negative Zellmodell nicht ohne Einschränkungen auf eine klinische Situation übertragen. Die Patientinnen erhalten als adjuvante Systemtherapie eine Multichemotherapie und keine alleinige Gabe von Paclitaxel, s. Kapitel 1.1.3. Zum anderen wurden sehr geringe, subklinische Konzentrationen Paclitaxel verwendet, um diese Langzeit-Paclitaxel behandelte Zelllinie zu entwickeln. Im Rahmen einer Chemotherapie im klinischen Setting hingegen werden deutlich höhere, therapeutisch relevante Paclitaxel-Konzentrationen verwendet, um den Tumor möglichst effektiv zu therapieren.

Nach sieben Monaten der Langzeit-Paclitaxel-Behandlung konnte keine Paclitaxel-Resistenz in den triple-negativen Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Stattdessen sprachen die Ergebnisse für den Mechanismus der zellulären Differenzierung. Die Fallzahlen der durchgeführten Versuche reichen jedoch für den definitiven Ausschluss einer Resistenzentwicklung statistisch nicht aus. Es handelt sich hierbei lediglich um einen möglichen Erklärungsansatz. Weitere Versuche müssen durchgeführt werden, um mathematisch ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten. Anhand der dargestellten

Ergebnisse ließen sich keine konkreten Hinweise ableiten, ob die Langzeit-Paclitaxel-Behandlung *in-vivo* auch keine Resistenzen auslöst.

Die in Kapitel 3.3.4 beschriebene Behandlung der Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen für die Dosis-Wirkungskurven konnte aus logistischen Gründen nicht für alle Versuchsreihen am selben Tag gestartet werden. Daraus ergibt sich das Problem, dass die Zellen, die nicht für den ersten Versuchstag verwendet werden konnten, weiter inkubiert werden mussten. Um eine Vergleichbarkeit der Behandlung sicherzustellen, wurden diese Zellen jedoch nicht erneut mit Paclitaxel behandelt. Zwar waren nach mikroskopischer Kontrolle vor jedem weiteren Versuch keine signifikanten zellmorphologischen Veränderungen festzustellen, dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass die fehlende Paclitaxel-Behandlung wieder zu einer leichten Umstrukturierung der Zellen geführt hat.

Die beobachteten Unterschiede in der IC_{50} von DMSO, s. Tabelle 4.1-4.5, lassen sich vermutlich durch verschiedene Ausgangsbedingungen in der Zellkultur erklären, da die Versuche zeitlich hintereinander durchgeführt wurden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Unterschiede nicht Ausdruck eines pharmakologischen Effektes von DMSO sind.

5.5 Ausblick

Wegen der o.g. Limitationen ist es notwendig weitere Untersuchung zur adjuvanten Wirkung von Lalistat durchzuführen.

Ein Ansatz, die Grundlagenforschung im Bereich der Lipaseinhibition zu ergänzen wäre, anstatt der kommerziell erhältlichen Zelllinien, menschliche Brustkrebszellen zu verwenden.

Aktuelle Ansätze beschäftigen sich bereits mit der präklinischen Prüfung von Lalistat im Tiermodell. Geplant ist die Verwendung von patient-derived-Xenograft-Modellen. Dabei werden immundefizienten Mäusen menschliche Krebszellen eingepflanzt. Man geht davon aus, dass dies die reale Situation in der Patientin bereits relativ gut simulieren kann [183]. Sollten die Tierversuche eine adjuvante Wirkung von Lalistat zeigen und die Toxizität eine Verwendung am Menschen rechtfertigen, würde sich die Phase-1-Studie am Menschen anschließen.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen ausführlicher molekulargenetisch zu charakterisieren. Damit könnte eine höhere Aussagekraft bezüglich Resistenzentwicklung und Lipaseinhibition erreicht werden.

5.6 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lalistat als spezifischer Inhibitor der lysosomalen sauren Lipase einen adjuvanten Effekt auf verschiedene Brustkrebszelllinien in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms zeigt.

Über den Eingriff in den Lipidmetabolismus und die damit einhergehende Hemmung der zellulären Lipidverwertung wird die Tumorpheriferation blockiert.

Bei adjuvanter Lipasehemmung mit Lalistat konnte im Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs, Tamoxifen-resistenten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs und in Langzeit-Paclitaxel behandelten triple-negativen Brustkrebszellen eine signifikante Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine adjuvante Behandlung mit Lalistat die Brustkrebstherapie insbesondere bei schwerbehandelbaren Subtypen signifikant verbessern könnte. Das Konzept sollte in Richtung einer späteren klinischen Anwendung weiterentwickelt werden.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten: Brustkrebs (Mammakarzinom), 2019, <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs.html> (abgerufen am: 01.08.2023).
2. Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten: Brustdrüse - C50, Kapitel aus „Krebs in Deutschland“, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c50_brust.pdf?__blob=publicationFile (abgerufen am: 01.08.2023).
3. Key, T.J., et al., *Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies*. Lancet Oncol, 2013. **14**(10): p. 1009-19.
4. Sun, Y.S., et al., *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. Int J Biol Sci, 2017. **13**(11): p. 1387-1397.
5. Hamajima, N., et al., *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer, 2002. **87**(11): p. 1234-45.
6. Brown, K.A., *Metabolic pathways in obesity-related breast cancer*. Nature Reviews Endocrinology, 2021. **17**(6): p. 350-363.
7. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-752.
8. Prat, A., et al., *Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer*. The Breast, 2015. **24**: p. S26-S35.
9. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2011. **22**(8): p. 1736-1747.
10. Prat, A., et al., *Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(2): p. 203-9.
11. Goldhirsch, A., et al., *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*. Annals of Oncology, 2013. **24**(9): p. 2206-2223.
12. Maisonneuve, P., et al., *Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes*. Breast cancer research : BCR, 2014. **16**(3): p. R65-R65.
13. Foulkes, W.D., I.E. Smith and J.S. Reis-Filho, *Triple-Negative Breast Cancer*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(20): p. 1938-1948.
14. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. Jama, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
15. Kumar, P. and R. Aggarwal, *An overview of triple-negative breast cancer*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2016. **293**(2): p. 247-269.
16. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, 2021, AWMF Registernummer: 032-0450L*,

<http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
(abgerufen am: 28.07.2023).

17. Houssami, N., et al., *The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: a meta-analysis*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21**(3): p. 717-30.
18. Moran, M.S., et al., *Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Stages I and II Invasive Breast Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2014. **32**(14): p. 1507-1515.
19. Kim, M.K., et al., *Effect of cosmetic outcome on quality of life after breast cancer surgery*. *European Journal of Surgical Oncology*, 2015. **41**(3): p. 426-432.
20. Cabanas, R.M., *An approach for the treatment of penile carcinoma*. *Cancer*, 1977. **39**(2): p. 456-466.
21. Lyman, G.H., et al., *Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update*. *Journal of Clinical Oncology*, 2014. **32**(13): p. 1365-1383.
22. Clarke, M., et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. *Lancet*, 2005. **366**(9503): p. 2087-106.
23. Poortmans, P.M., et al., *Internal Mammary and Medial Supraclavicular Irradiation in Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2015. **373**(4): p. 317-327.
24. Bellon, J.R., et al., *Sequencing of Chemotherapy and Radiation Therapy in Early-Stage Breast Cancer: Updated Results of a Prospective Randomized Trial*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(9): p. 1934-1940.
25. Hickey, B.E., D.P. Francis and M. Lehman, *Sequencing of chemotherapy and radiation therapy for early breast cancer*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2006(4).
26. Ebtctg, *Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials*. *The Lancet*, 2014. **383**(9935): p. 2127-2135.
27. Osborne, C.K., et al., *Effects of Tamoxifen on Human Breast Cancer Cell Cycle Kinetics: Accumulation of Cells in Early G₂ Phase*. *Cancer Research*, 1983. **43**(8): p. 3583.
28. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1998. **90**(18): p. 1371-1388.
29. Hershman, D.L., et al., *Early discontinuation and nonadherence to adjuvant hormonal therapy in a cohort of 8,769 early-stage breast cancer patients*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2010. **28**(27): p. 4120-4128.
30. Hull, D.F., 3rd, et al., *Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer*. *Cancer Res*, 1983. **43**(1): p. 413-6.
31. Wiebe, V.J., et al., *Tamoxifen resistance in breast cancer*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 1993. **14**(3): p. 173-188.
32. Osborne, C.K., et al., *Acquired tamoxifen resistance: correlation with reduced breast tumor levels of tamoxifen and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen*. *J Natl Cancer Inst*, 1991. **83**(20): p. 1477-82.

33. Wang, X., et al., *STAT3 mediates resistance of CD44(+)CD24(-/low) breast cancer stem cells to tamoxifen in vitro*. J Biomed Res, 2012. **26**(5): p. 325-35.
34. Labrie, F., et al., *Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone*. Endocr Rev, 2003. **24**(2): p. 152-82.
35. Sasano, H., et al., *In situ estrogen production and its regulation in human breast carcinoma: from endocrinology to intracrinology*. Pathology international, 2009. **59**(11): p. 777-789.
36. Simpson, E.R., et al., *Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis*. Endocr Rev, 1994. **15**(3): p. 342-55.
37. Silva, M.C., et al., *Intratumoral aromatase as a prognostic factor in human breast carcinoma*. Cancer Res, 1989. **49**(10): p. 2588-91.
38. Hanamura, T. and S.-i. Hayashi, *Overcoming aromatase inhibitor resistance in breast cancer: possible mechanisms and clinical applications*. Breast Cancer, 2018. **25**(4): p. 379-391.
39. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(2): p. 127-137.
40. Swain, S.M., M. Shastry and E. Hamilton, *Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions*. Nat Rev Drug Discov, 2023. **22**(2): p. 101-126.
41. Petrelli, F. and S. Barni, *Meta-analysis of concomitant compared to sequential adjuvant trastuzumab in breast cancer: the sooner the better*. Medical Oncology, 2012. **29**(2): p. 503-510.
42. Cameron, D., et al., *11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial*. Lancet (London, England), 2017. **389**(10075): p. 1195-1205.
43. Seidman, A., et al., *Cardiac Dysfunction in the Trastuzumab Clinical Trials Experience*. Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(5): p. 1215-1221.
44. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G.R. and M.J. Clarke, *Multi-agent chemotherapy for early breast cancer*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2001(4).
45. Mamounas, E.P., et al., *Paclitaxel After Doxorubicin Plus Cyclophosphamide As Adjuvant Chemotherapy for Node-Positive Breast Cancer: Results From NSABP B-28*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(16): p. 3686-3696.
46. Wani, M.C., et al., *Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. Journal of the American Chemical Society, 1971. **93**(9): p. 2325-2327.
47. Rowinsky, E.K. and R.C. Donehower, *Paclitaxel (Taxol)*. New England Journal of Medicine, 1995. **332**(15): p. 1004-1014.
48. Weiss, R.B., et al., *Hypersensitivity reactions from taxol*. Journal of Clinical Oncology, 1990. **8**(7): p. 1263-1268.
49. Tewey, K.M., et al., *Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II*. Science, 1984. **226**(4673): p. 466-8.
50. Doroshow, J.H., *Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart*. Cancer Res, 1983. **43**(2): p. 460-72.
51. Chatterjee, K., et al., *Doxorubicin cardiomyopathy*. Cardiology, 2010. **115**(2): p. 155-62.

52. Kaufmann, M., et al., *Recommendations From an International Expert Panel on the Use of Neoadjuvant (Primary) Systemic Treatment of Operable Breast Cancer: An Update*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(12): p. 1940-1949.
53. Conforti, F., et al., *Evaluation of pathological complete response as surrogate endpoint in neoadjuvant randomised clinical trials of early stage breast cancer: systematic review and meta-analysis*. Bmj, 2021. **375**: p. e066381.
54. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. Embo j, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
55. Brown, J.A., et al., *Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1257-66.
56. Emens, L.A., et al., *Atezolizumab and nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Biomarker Evaluation of the IMpassion130 Study*. J Natl Cancer Inst, 2021. **113**(8): p. 1005-1016.
57. Schmid, P., et al., *Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer*. New England Journal of Medicine, 2020. **382**(9): p. 810-821.
58. Peto, J., et al., *Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 1999. **91**(11): p. 943-949.
59. Easton, D.F., D. Ford and D.T. Bishop, *Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(1): p. 265-71.
60. Couch, F.J., et al., *Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(4): p. 304-11.
61. Atchley, D.P., et al., *Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(26): p. 4282-8.
62. Dorling, L., et al., *Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women*. N Engl J Med, 2021. **384**(5): p. 428-439.
63. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.
64. Xu, X., et al., *Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities*. Mol Cancer, 2020. **19**(1): p. 165.
65. Suzuki, H., et al., *Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer*. Br J Cancer, 2008. **98**(6): p. 1147-56.
66. Garcia-Martinez, L., et al., *Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1786.
67. Hatsell, S., et al., *β -Catenin and Tcfs in Mammary Development and Cancer*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2003. **8**(2): p. 145-158.
68. Jang, G.B., et al., *Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12465.
69. Wils, L. and M. Bijlsma, *Epigenetic regulation of the Hedgehog and Wnt pathways in cancer*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2017. **121**.
70. Warburg, O., *On the Origin of Cancer Cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-314.
71. Liu, C., Y. Jin, and Z. Fan, *The Mechanism of Warburg Effect-Induced Chemoresistance in Cancer*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 698023.
72. Patra, K.C. and N. Hay, *The pentose phosphate pathway and cancer*. Trends in Biochemical Sciences, 2014. **39**(8): p. 347-354.

73. Antalis, C.J., et al., *Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification*. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2011. **28**(8): p. 733-741.
74. Ackerman, D. and M.C. Simon, *Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment*. *Trends in Cell Biology*, 2014. **24**(8): p. 472-478.
75. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. *Nature Reviews Cancer*, 2007. **7**(10): p. 763-777.
76. Kuhajda, F.P., et al., *Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(14): p. 6379-83.
77. Alo, P.L., et al., *Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients*. *Cancer*, 1996. **77**(3): p. 474-482.
78. Liu, H., Y. Liu and J.-T. Zhang, *A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction*. *Molecular cancer therapeutics*, 2008. **7**(2): p. 263-270.
79. Goldberg, I.J., R.H. Eckel and N.A. Abumrad, *Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways*. *J Lipid Res*, 2009. **50** Suppl(Suppl): p. S86-90.
80. Kuemmerle, N.B., et al., *Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation*. *Molecular cancer therapeutics*, 2011. **10**(3): p. 427-436.
81. Antalis, C.J., et al., *High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010. **122**(3): p. 661-670.
82. Rotheneder, M. and G.M. Kostner, *Effects of low- and high-density lipoproteins on the proliferation of human breast cancer cells in vitro: differences between hormone-dependent and hormone-independent cell lines*. *Int J Cancer*, 1989. **43**(5): p. 875-9.
83. Wilfling, F., et al., *Lipid droplet biogenesis*. *Current opinion in cell biology*, 2014. **29**: p. 39-45.
84. Jacquier, N., et al., *Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 2011. **124**(14): p. 2424.
85. Tauchi-Sato, K., et al., *The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(46): p. 44507-44512.
86. Maan, M., et al., *Lipid metabolism and lipophagy in cancer*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018. **504**(3): p. 582-589.
87. Aboumrad, M.H., R.C. Horn, Jr. and G. Fine, *Lipid-secreting mammary carcinoma. Report of a case associated with Paget's disease of the nipple*. *Cancer*, 1963. **16**: p. 521-5.
88. Petan, T., E. Jarc and M. Jusović, *Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2018. **23**(8): p. 1941.
89. Young, S.G. and R. Zechner, *Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis*. *Genes Dev*, 2013. **27**(5): p. 459-84.
90. Nakatogawa, H., et al., *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009. **10**(7): p. 458-467.
91. Schulze, R.J., A. Sathyanarayan and D.G. Mashek, *Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy*. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 2017. **1862**(10 Pt B): p. 1178-1187.

92. Singh, R., et al., *Autophagy regulates lipid metabolism*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1131-1135.
93. Spillane, J.B. and M.A. Henderson, *CANCER STEM CELLS: A REVIEW*. ANZ Journal of Surgery, 2007. **77**(6): p. 464-468.
94. Zhang, L., et al., *Targeting Breast Cancer Stem Cells*. Int J Biol Sci, 2023. **19**(2): p. 552-570.
95. Li, H., et al., *Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)-expressing cells are enriched in triple-negative breast cancer*. Int J Biol Markers, 2013. **28**(4): p. e357-64.
96. Ponta, H., L. Sherman and P.A. Herrlich, *CD44: From adhesion molecules to signalling regulators*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(1): p. 33-45.
97. Du, L., et al., *CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6751-60.
98. Jaggupilli, A. and E. Elkord, *Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 708036.
99. Kristiansen, G., et al., *CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4906-13.
100. Sara, R., et al., *Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype*. Journal of Clinical Pathology, 2011. **64**(11): p. 937.
101. Tomita, H., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(10): p. 11018-32.
102. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 555-67.
103. Wang, T., et al., *JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance*. Cell Metab, 2018. **27**(1): p. 136-150.e5.
104. Hershey, B.J., et al., *Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells*. J Clin Med, 2019. **9**(1).
105. Goldstein, J.L., et al., *Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease*. J Biol Chem, 1975. **250**(21): p. 8487-95.
106. Dubland, J.A. and G.A. Francis, *Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2015. **3**(3).
107. Li, F. and H. Zhang, *Lysosomal Acid Lipase in Lipid Metabolism and Beyond*. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 2019. **39**(5): p. 850-856.
108. Borgquist, S., et al., *Cholesterol, Cholesterol-Lowering Medication Use and Breast Cancer Outcome in the BIG 1-98 Study*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(11): p. 1179-1188.
109. Harborg, S., et al., *Statin use and breast cancer recurrence in postmenopausal women treated with adjuvant aromatase inhibitors: a Danish population-based cohort study*. Breast cancer research and treatment, 2020. **183**(1): p. 153-160.
110. Shaitelman, S.F., et al., *Impact of Statin Use on Outcomes in Triple Negative Breast Cancer*. Journal of Cancer, 2017. **8**(11): p. 2026-2032.
111. Shim, S.H., et al., *Disrupting cholesterol esterification by bitter melon suppresses triple-negative breast cancer cell growth*. Molecular Carcinogenesis, 2018. **57**(11): p. 1599-1607.

112. Hamilton, J., et al., *A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(15-16): p. 1207-10.
113. Du, H., et al., *Lysosomal acid lipase-deficient mice: depletion of white and brown fat, severe hepatosplenomegaly, and shortened life span*. J Lipid Res, 2001. **42**(4): p. 489-500.
114. McNeely, W. and P. Benfield, *Orlistat*. Drugs, 1998. **56**(2): p. 241-249.
115. Menendez, J.A., L. Vellon, and R. Lupu, *Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical®) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene*. Annals of Oncology, 2005. **16**(8): p. 1253-1267.
116. Steigerwald, H., et al., *Lysosomal acid lipase-activity as a novel target to efficiently address triple-negative breast cancer high malignancy*. bioRxiv, 2023: p. 2023.10.01.560038.
117. Liu, X., et al., *Targeting LIPA independent of its lipase activity is a therapeutic strategy in solid tumors via induction of endoplasmic reticulum stress*. Nature Cancer, 2022. **3**(7): p. 866-884.
118. Zhang, H., *Lysosomal acid lipase and lipid metabolism: new mechanisms, new questions and new therapies*. Current opinion in lipidology, 2018. **29**(3): p. 218-223.
119. Cailleau, R., M. Olivé and Q.V. Cruciger, *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*. In Vitro, 1978. **14**(11): p. 911-5.
120. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-16.
121. *Promega: Technical Bulletin, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*, https://www.promega.de/en/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570#protocols (abgerufen am: 19.08.2023).
122. *Promega: Technical Manual, CellTox® Green Cytotoxicity Assay*, <https://www.promega.de/en/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltox-green-cytotoxicity-assay/?catNum=G8741#protocols>, (abgerufen am: 19.08.2023).
123. Sprouse, A.A. and B.S. Herbert, *Resveratrol augments paclitaxel treatment in MDA-MB-231 and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 breast cancer cells*. Anticancer Res, 2014. **34**(10): p. 5363-74.
124. Froidevaux-Klipfel, L., et al., *Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231*. Proteomics, 2011. **11**(19): p. 3877-86.
125. *Promega: Technical Manual, ReliaPrep® RNA Cell Miniprep System*, <https://www.promega.de/products/nucleic-acid-extraction/rna/reliaprep-rna-miniprep-systems/?catNum=Z6010#protocols>, (abgerufen am: 19.08.2023).
126. *Invitrogen: SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR*, https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fsuperscript_firststrand_man.pdf (abgerufen am: 19.08.2023).
127. Bender, R., A. Ziegler and S. Lange, *Varianzanalyse*. Dtsch Med Wochenschr, 2007: p. 132: e57-e60.

128. Christofori, G. and H. Semb, *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(2): p. 73-6.
129. Chen, Z., Z. Fang and J. Ma, *Regulatory mechanisms and clinical significance of vimentin in breast cancer*. Biomed Pharmacother, 2021. **133**: p. 111068.
130. Deming, S.L., et al., *C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance*. Br J Cancer, 2000. **83**(12): p. 1688-95.
131. Sawada, M., et al., *Increased plasma lipids in triple-negative breast cancer and impairment in HDL functionality in advanced stages of tumors*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 8998.
132. de Gonzalo-Calvo, D., et al., *Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study*. BMC cancer, 2015. **15**: p. 460-460.
133. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. Cell Metab, 2016. **23**(1): p. 27-47.
134. Lo, P.K., et al., *LIPG signaling promotes tumor initiation and metastasis of human basal-like triple-negative breast cancer*. Elife, 2018. **7**.
135. Slebe, F., et al., *FoxA and LIPG endothelial lipase control the uptake of extracellular lipids for breast cancer growth*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11199.
136. Lo, P.-K., Y. Yao and Q. Zhou, *Inhibition of LIPG phospholipase activity suppresses tumor formation of human basal-like triple-negative breast cancer*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 8911-8911.
137. Manupati, K., et al., *Activation of CD44-Lipoprotein lipase axis in breast cancer stem cells promotes tumorigenesis*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021. **1867**(11): p. 166228.
138. Carracedo, A., L.C. Cantley and P.P. Pandolfi, *Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight*. Nature reviews. Cancer, 2013. **13**(4): p. 227-232.
139. Ito, K., et al., *A PML-PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1350-8.
140. Hershey, B.J., et al., *Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells*. Journal of clinical medicine, 2019. **9**(1): p. 87.
141. van der Windt, G.J., et al., *Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development*. Immunity, 2012. **36**(1): p. 68-78.
142. Phi, L.T.H., et al., *Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment*. Stem Cells International, 2018. **2018**: p. 5416923.
143. Denard, B., C. Lee and J. Ye, *Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1*. eLife, 2012. **1**: p. e00090.
144. Santos, C.R. and A. Schulze, *Lipid metabolism in cancer*. The FEBS Journal, 2012. **279**(15): p. 2610-2623.
145. Jia, L., et al., *Paclitaxel inhibits ovarian tumor growth by inducing epithelial cancer cells to benign fibroblast-like cells*. Cancer Lett, 2012. **326**(2): p. 176-82.
146. Chao, C.-C., et al., *Induction of neural differentiation in rat C6 glioma cells with taxol*. Brain and Behavior, 2015. **5**(12): p. e00414.
147. Wang, X.-P., et al., *Live morphological analysis of taxol-induced cytoplasmic vacuolization in human lung adenocarcinoma cells*. Micron, 2008. **39**(8): p. 1216-1221.
148. Zhang, S., I. Mercado-Uribe and J. Liu, *Tumor stroma and differentiated cancer cells can be originated directly from polyploid giant cancer cells induced by paclitaxel*. International Journal of Cancer, 2014. **134**(3): p. 508-518.

149. Li, G., et al., *Paclitaxel inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by blocking activation of the PI3K/AKT signaling pathway*. *Adv Clin Exp Med*, 2020. **29**(11): p. 1337-1345.
150. Hu, B., et al., *CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(4): p. 5627-5633.
151. Litviakov, N., et al., *Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis*. *Oncotarget*, 2020. **11**(21): p. 1988-2001.
152. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-674.
153. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(7): p. 3983.
154. Li, W., et al., *Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 13856-13856.
155. Pham, P.V., et al., *Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy*. *Journal of Translational Medicine*, 2011. **9**(1): p. 209.
156. Van Phuc, P., et al., *Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44CD24 breast cancer cells*. *Onco Targets Ther*, 2011. **4**: p. 71-8.
157. Shiozaki, H., et al., *Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers*. *The American journal of pathology*, 1991. **139**(1): p. 17-23.
158. Hunt, N.C.A., et al., *Loss of E-cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas*. *Virchows Archiv*, 1997. **430**(4): p. 285-289.
159. Li, P., et al., *The expressions of NEDD9 and E-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis in triple-negative breast cancer patients*. *OncoTargets and therapy*, 2016. **9**: p. 5751-5759.
160. Yamashita, N., et al., *Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2013. **139**(5): p. 739-746.
161. McInroy, L. and A. Määttä, *Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **360**(1): p. 109-14.
162. Escot, C., et al., *Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(13): p. 4834-8.
163. Cappellen, D., et al., *Novel c-MYC target genes mediate differential effects on cell proliferation and migration*. *EMBO Rep*, 2007. **8**(1): p. 70-6.
164. Mezquita, P., et al., *Myc regulates VEGF production in B cells by stimulating initiation of VEGF mRNA translation*. *Oncogene*, 2005. **24**(5): p. 889-901.
165. Baptista, M.Z., et al., *Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer*. *Human pathology*, 2016. **47**(1): p. 78-84.
166. Muenst, S., et al., *The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **139**(3): p. 667-76.
167. Muenst, S., et al., *Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **146**(1): p. 15-24.
168. Sabatier, R., et al., *Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(7): p. 5449-64.

169. Allegra, J.C., et al., *Association between steroid hormone receptor status and disease-free interval in breast cancer*. *Cancer Treat Rep*, 1979. **63**(8): p. 1271-7.
170. Cooke, T., et al., *Oestrogen receptors and prognosis in early breast cancer*. *Lancet*, 1979. **1**(8124): p. 995-7.
171. Vicente-Dueñas, C., et al., *Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm*. *Embo j*, 2013. **32**(11): p. 1502-13.
172. Michels, T., et al., *Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner*. *J Immunotoxicol*, 2012. **9**(3): p. 292-300.
173. Efeyan, A., W.C. Comb and D.M. Sabatini, *Nutrient-sensing mechanisms and pathways*. *Nature*, 2015. **517**(7534): p. 302-10.
174. Guo, D., E.H. Bell and A. Chakravarti, *Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy*. *CNS Oncol*, 2013. **2**(3): p. 289-99.
175. Phillips, T.M., W.H. McBride and F. Pajonk, *The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(24): p. 1777-85.
176. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, *Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(2): p. R25.
177. Tian, J., et al., *Dasatinib sensitises triple negative breast cancer cells to chemotherapy by targeting breast cancer stem cells*. *British journal of cancer*, 2018. **119**(12): p. 1495-1507.
178. Shyu, P., Jr., et al., *Dropping in on lipid droplets: insights into cellular stress and cancer*. *Biosci Rep*, 2018. **38**(5).
179. Hultsch, S., et al., *Association of tamoxifen resistance and lipid reprogramming in breast cancer*. *BMC cancer*, 2018. **18**(1): p. 850-850.
180. Leung, E.Y., et al., *Endocrine Therapy of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells: Early Differential Effects on Stem Cell Markers*. *Frontiers in oncology*, 2017. **7**: p. 184-184.
181. Simões, B.M., et al., *Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2011. **129**(1): p. 23-35.
182. Liu, H., et al., *Tamoxifen-resistant breast cancer cells possess cancer stem-like cell properties*. *Chin Med J (Engl)*, 2013. **126**(16): p. 3030-4.
183. Lai, Y., et al., *Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2017. **10**(1): p. 106.

Danksagung

Für die Unterstützung im Rahmen meiner Dissertation möchte ich einigen Personen besonders danken, die maßgeblich an der Realisierung des Projektes beteiligt waren.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Tanja Fehm für die Überlassung des Forschungsthemas und die Betreuung bedanken. Von ihrer großen wissenschaftlichen Erfahrung habe ich im Rahmen der Anfertigung meiner Dissertation sehr profitieren können.

Herrn Prof. Dr. med. Georg Pongratz möchte ich für die Zweitbetreuung meiner Dissertation danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. nat. med. Knud Esser, der mir als wesentliche Begleitung während des gesamten Promotionsprojektes mit seiner fachlichen Expertise zur Seite stand und mich geduldig in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt hat.

Auch bedanken möchte ich mich bei dem gesamten Team des Forschungslabors der Frauenklinik Düsseldorf, insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wirkstoffentwicklung.

In ganz besonderer Weise danke ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung.